

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ГОРОДСКОГО ХОЗЯЙСТВА имени А. Н. БЕКЕТОВА**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
К ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ
ПО ДИСЦИПЛИНЕ**

МИКРОБИОЛОГИЯ

*(для студентов 4 курса дневной и заочной форм обучения
направления подготовки 6.060103 «Гидротехника (Водные ресурсы)»
и слушателей второго высшего образования специальности
7.06010108 «Водоснабжение и водоотведение»)*

Харьков – ХНУГХ – 2014

Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Микробиология» (для студентов 4 курса дневной и заочной форм обучения направления подготовки 6.060103 «Гидротехника (Водные ресурсы)» и слушателей второго высшего образования специальности 7.06010108 «Водоснабжение и водоотведение») / Харьк. нац. ун-т гор. хоз-ва им. А. Н. Бекетова; сост.: Е. А. Ковалева. – Х.: ХНУГХ, 2014. – 58 с.

Составитель: Е. А. Ковалева

Рецензент: к.т.н., доцент Г. И. Благодарная

Утверждено кафедрой водоснабжения, водоотведения и очистки вод, протокол №4 от 20.10.2012 г.

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Введение	4
ЛР №1. Питательные среды. Методы приготовления.....	5
ЛР №2. Посевы микроорганизмов.....	11
ЛР №3. Самоочищение водоемов. Зоны сапробности.....	15
ЛР №4. Санитарно-бактериологический анализ.....	24
ЛР №5. Индикаторные микроорганизмы.....	40
ЛР №6. Биологический анализ активного ила и биопленки.....	49
Приложения	53
Список источников	57

ВВЕДЕНИЕ

На современном уровне развития естественных наук требуются глубокие знания микробиологических процессов, лежащих в основе многих биотехнологических производств и служащих гарантией защиты окружающей среды от антропогенного воздействия.

Помимо приобретения теоретических знаний по микробиологии будущим специалистам по очистке природных и сточных вод необходимы лабораторно-практические занятия. Поэтому, цель лабораторных занятий – закрепить и углубить знания теоретического материала, научиться распознавать отдельные группы и виды микроорганизмов, приобрести необходимые умения и навыки в определении по микробиологическим показателям безопасности питьевой воды и санитарно-гигиенического состояния очистных и других сооружений.

Каждая лабораторная работа настоящих указаний содержит краткое обоснование цели работы, описание техники и методики постановки опыта, анализа полученных результатов, а также перечень необходимых материалов и оборудования для проведения работы. В конце каждой работы приведены контрольные вопросы для закрепления полученных знаний.

Во время подготовки к занятиям студенты должны тщательно изучить теоретический материал в соответствии с конспектом лекций и литературными источниками. Лабораторные работы выполняются в соответствии с методическими указаниями. В конце каждого занятия предусмотрена защита выполненных студентами работ.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ. МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ

Цель работы:

1. Ознакомиться с классификацией питательных сред.
2. Ознакомиться с техникой приготовления основных питательных сред (мясопептонный бульон – МПБ, мясопептонный агар – МПА, сусло-агар СА).

1.1. Теоретические сведения

1.1.1. Питательные среды

Микроорганизмам, как и всем другим организмам, нужен набор различных химических элементов. Некоторые элементы (С, Н, Р, О, S, Са, Mg, К) нужны в относительно больших количествах, поэтому их относят к **макроэлементам**, других элементов (Zn, Mn, Со, No, В, Cu, I) - достаточно наличия следов, поэтому их называют **микроэлементами**. Кроме этого, микроорганизмам нужны некоторые готовые органические соединения, которые называют **факторами роста**.

Исходя, из питательных потребностей микроорганизмов для их выращивания в лабораторных условиях создают питательные (культурные) среды, содержащие набор органических и минеральных веществ, которые обеспечивают рост и развитие микроорганизмов. Питательные среды имеют исключительное значение в микробиологии. Правильный подбор состава среды обеспечивает возможность выделения микроорганизмов с мест их жилища, получение чистых культур, изучение их биохимических особенностей, способствует быстрой и правильной диагностике инфекционных болезней, дает возможность получать биомассу полезных для народного хозяйства микроорганизмов.

По происхождению и составу питательные среды можно разделить на натуральные (природные), синтетические и полусинтетические.

Натуральные среды бывают растительного и животного происхождения. Они содержат в своем составе все ингредиенты, необходимые для роста и развития микроорганизмов. Состав этих сред точно не определен. Такими средами являются отвары злаков, трав, овощные и фруктовые соки, картофель, морковь, молоко, животные ткани, кровь, сыворотка, моча, отвары мяса, морская и озерная вода и минеральные источники, яйца птиц, их зародыши и другие. Примером натуральных сред, которые наиболее часто используют, являются мясопептонный бульон (МПБ).

Для его приготовления готовят мясной отвар. С этой целью свежее мясо (говядину, телятину или конину) освобождают от костей, жира, сухожилий, рубят и пропускают через мясорубку 500 г такого фарша, кладут в кастрюлю, заливают 1 л водопроводной воды и оставляют в прохладном месте на 24 часа или в термостате при температуре 30°C на 6 часов, а при 37°C - на 2 часа для экстрагирования разнообразных необходимых для пищи микроорганизмов веществ. Затем мясо отжимают через марлю, и полученный настой кипятят в течение 30 минут для сворачивания белка, который отделяют фильтрованием. После того, как настой остынет, его фильтруют через складной бумажный фильтр, предварительно смоченный водой (или сквозь фильтровальное полотно, которое накладывают на стеклянную воронку). Влажный бумажный

фильтр не очень крепкий, поэтому жидкость на него наливают осторожно по стенке. Отфильтрованный настой стерилизуют. Стерильная мясная вода является основой для приготовления мясопептонного бульона. Для этого к 1 л мясной воды добавляют 10 г пептона и 5 г NaCl. После 10-15 минут кипячения его охлаждают, устанавливают необходимое значение pH, фильтруют и стерилизуют. Пептоны добавляют вместо свернутого мясного белка. Они являются продуктом неполного разрушения белка, их получают кислотным или ферментативным гидролизом мяса или молочного казеина. Преимуществом этих источников аминокислот является то, что они легче усваиваются и при стерилизации не сворачиваются, поэтому стерильный бульон остается прозрачным. Рост микроорганизмов в таких средах легче определяется при появлении помутнения.

Для выращивания микроорганизмов в качестве питательной среды широко используется также нехмельное пивное сусло. Этот субстрат, так же, как и мясная вода, содержит большое количество полезных веществ (аминокислот, нуклеиновых кислот, витаминов, минеральных солей). Для приготовления сусла используют пророщенные ячменные семена (солод), в которых активизируются протеолитические и аминолитические ферменты.

Дрожжевая среда используется для культивирования многих гетеротрофов. Готовится она из свежих или прессованных дрожжей. Грунтовая вытяжка применяется для выделения и культивирования микроорганизмов почвы.

Синтетические среды готовят из определенных химически чистых соединений указанных концентраций. В таких средах изучают обмен веществ микроорганизмов, потому что в них можно учесть количество и качество веществ, которые поступают в клетки, изменения этих соединений под воздействием микроорганизмов, выявить метаболиты, которые выделяются бактериальными клетками в процессе жизнедеятельности. Преимущество синтетических сред заключается в их способности к воспроизводству. В зависимости от потребности микроорганизмов синтетические среды могут быть очень сложного или очень простого состава. Примером синтетической среды является среда Чапека для выращивания плесневых грибов.

Полусинтетические среды имеют сложный состав. Компонентами этих сред (углеводы, фосфаты, нитраты и другие) являются натуральные продукты: мясной отвар, дрожжевой экстракт, пивное сусло. Такие среды используют для выращивания микроорганизмов в лабораторных условиях и промышленности.

Среды для одного и того же микроорганизма могут быть различными в зависимости от задач исследования.

По назначению среды бывают:

Стандартные или среды общего назначения. В таких средах выращивают или накапливают биомассу многих микроорганизмов - это МПА, МПБ, МПЖ и другие.

Специальные среды или среды специального назначения. Эти среды предназначены для выявления тех или других биохимических особенностей микроорганизмов или для получения их культур, которые обладают особыми свойствами.

Кроме специальных сред выделяют *элективные (избирательные) и дифференциально-диагностические среды.*

Элективные среды (от лат. *Elektys* – выбираю) подбираются таким образом, чтобы обеспечить наиболее благоприятные условия для выращивания определенных микроорганизмов. К ним могут быть добавлены вещества, которые избирательно подавляют развитие сопутствующей микрофлоры. При посеве на такие среды исследуемых материалов, которые содержат смесь различных микроорганизмов, прежде всего, будет проявляться рост того вида, для которого эта среда будет выборочной. Эти среды используют для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания или для получения накопительных культур. Примером может быть среда Эшби для азотфиксирующих бактерий.

Дифференциально-диагностические среды используют для определения видовой принадлежности исследовательских микроорганизмов, учитывая особенности обмена их веществ. Состав этих сред позволяет четко выявить наиболее характерные свойства микроорганизмов. К ним относятся среды с молоком, кровью, желатином, на которых изучаются протеолитические и гемолитические свойства микроорганизмов. Наличие желатиназы и других протеолитических ферментов определяют по разжижению желатина, свернутого яичного или сывороточного белка. Примером таких сред является среда Эндо, которая используется для выделения и определения бактерий кишечной палочки. Она отличается от других представителей микрофлоры кишечника тем, что образует колонии красного цвета с металлическим блеском.

Среды классифицируются *по консистенции*. Используются *жидкостные, сухие сыпучие и плотные среды*.

Жидкостные среды используют для накопления биомассы или метаболитов микроорганизмов. Это способствует обновлению культур, которые долго хранятся, поддержки и предохранению тех культур, которые плохо растут на плотных средах. На жидкостных средах легче проявляются физиолого-биохимические особенности микроорганизмов.

Сухие сыпучие среды используются в основном промышленной микробиологией. Это разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, пропитанный питательным раствором.

Плотные среды необходимы для выделения и описания культурных свойств чистых культур микроорганизмов, потому что на них возможно получить изолированный рост отдельных клеток; для хранения культур, определения ряда их свойств (например, антагонистических отношений между микроорганизмами). Плотные питательные среды готовят из жидкостных с добавлением к ним агар-агара, геля, желатины.

Агар-агар является лучшим желеобразующим веществом (малайское желе), производится из водорослей. Это сложный полисахарид, который образует гель с температурой плавления 36-100⁰С и температурой застывания возле 40⁰С. Поэтому, на средах с агаром возможно культивировать микроорганизмы при любой температуре. Кроме того, агар-агар, как питательный субстрат, используется только не многими микроорганизмами. Плотные питательные среды получают добавлением к жидкостным 1-2% агар-агара. Таким образом с МПБ готовят МПА. Для получения более плотной среды иногда добавляют 3% агар-агара.

Желатина – это вещество белковой природы, которое получают из костей и хрящей животных при их виваривании. Желатин добавляют к среде в

количестве 10-12%. Как уплотнитель он используется ограниченно. Это связано с тем, что он разжижается под действием протеолитических ферментов. Кроме того, образованный желатиной гель плавится при температуре 23-25⁰С и застывает при 20⁰С, а большинство микроорганизмов развиваются при 30-37⁰С. При такой температуре среда находится в расплавленном состоянии. Поэтому желатина используется главным образом для выявления протеолитической активности микроорганизмов, для получения гигантских глубинных колоний дрожжей, при их идентификации.

Промышленным способом изготавливаются некоторые среды в виде **сухих порошков**. Преимущество таких сред заключается в их стандартности, стабильности, простоте приготовления и удобстве при транспортировке. Сухие питательные среды представляют собой гигроскопичные порошки, которые хранятся в специальных флаконах. В лаборатории из порошков готовят среды согласно рецептуре, указанной на этикетке. Чаще всего используют сухие среды Эндо, сухой питательный агар, рыбный питательный агар и другие.

Питательные среды сразу после приготовления стерилизуют.

1.2. Экспериментальная часть

Препарат «раздавленная капля»

На предметное стекло наносят каплю водопроводной воды и помещают в нее небольшое количество культуры изучаемых микроорганизмов, размещают и покрывают покровным стеклом. Культуру, выращенную на плотной питательной среде, переносят в каплю воды бактериологической петлей; культуру, выращенную в жидкой среде – стерильной пипеткой. В последнем случае каплю воды на предметное стекло можно не наносить. Капля исследуемого материала должна быть настолько мала, чтобы после прижимания ее покровным стеклом не было избытка, выступающего из-под него. В противном случае избыток жидкости необходимо удалить фильтровальной бумагой.

Препарат «раздавленная капля» используют для установления формы клеток микроорганизмов, их размеров и взаимного расположения, способа спорообразования, наличия или отсутствия подвижности.

Препарат «висячая капля»

Каплю, суспензии микроорганизмов петлей или обычным пером наносят на покровное стекло, которое переворачивают каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с углублением (лункой) в центре. Капля должна свободно висеть, не касаясь краев и дна лунки. Края лунки предварительно смазывают вазелином. Капля оказывается герметизированной во влажной камере, что делает возможным многодневное наблюдение за объектом.

Препарат «висячая капля» используют для наблюдения за размножением микроорганизмов, образованием и прорастанием спор, для выявления подвижности и отношения клеток к химическим раздражителям и т.д.

Препараты «раздавленная капля» и «висячая капля» особенно удобны для рассмотрения сравнительно крупных объектов – дрожжей, плесневых грибов.

Приготовление препарата фиксированных (убитых) клеток

Фиксированные окрашенные препараты используют для выявления морфологических особенностей, количественного учета микроорганизмов, а также для проверки чистоты культуры. Фиксированные окрашенные препараты рассматривают с иммерсионным объективом. Приготовление фиксированного окрашенного препарата включает следующие этапы: приготовление мазка, высушивание мазка, его фиксацию и окраску.

Приготовление мазка. На обезжиренное предметное стекло помещают маленькую капельку воды и переносят в нее петлей небольшое количество исследуемого материала, как для препарата «раздавленная капля». Получившуюся суспензию равномерно размазывают петлей на площади 1-2 см² возможно более тонким слоем. Мазок должен быть настолько тонким, чтобы высыхал тотчас же после приготовления.

Высушивание мазка. Лучше всего сушить препарат при комнатной температуре на воздухе. Хорошо приготовленный тонкий мазок высыхает очень быстро. Если высушивание мазка замедлено, то препарат можно слегка нагреть в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки, держа стекло мазком вверх. Эту операцию следует проводить крайне осторожно, не перегревая, мазка, иначе клетки микроорганизмов деформируются.

Фиксация. Фиксация препарата преследует несколько целей:

- убить микроорганизмы, т.е. сделать безопасным дальнейшее обращение с ними;
- обеспечить лучшее прилипание клеток к стеклу;
- сделать мазок более восприимчивым к окраске, так как мертвые клетки лучше окрашиваются, чем живые.

Самым распространенным способом фиксации является термическая обработка. Для этого препарат обычно трижды проводят через наиболее горячую часть пламени горелки, держа предметное стекло мазком вверх. Не следует перегревать мазок. Так как при этом происходит грубое изменение клеточных структур, а иногда и внешнего вида клеток, например, их сморщивание.

Окраска. Клетки микроорганизмов окрашивают главным образом анилиновыми красителями. Различают простые и дифференциальные способы окрашивания микроорганизмов. При простой окраске прокрашивается вся клетка, так что становятся хорошо видны ее форма и размеры. Дифференциальная окраска предполагает окрашивание не всей клетки, а определенных ее структур. С помощью дифференциальной окраски выявляют некоторые клеточные структуры, запасные вещества и включения. Для простого окрашивания клеток микроорганизмов чаще всего пользуются фуксином, генциановым фиолетовым, метиленовым синим. Фиксированный препарат помещают на параллельные стеклянные рейки, лежащие над кюветой, и заливают красителем на 1-3 минуты. Следят за тем, чтобы во время окрашивания раствор красителя на мазке не подсыхал. В случае необходимости на мазок наливают новые порции красителя. По окончании окраски препарат промывают водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Затем препарат высушивают на воздухе или осторожно промокают фильтровальной бумагой, помещают на окрашенный мазок каплю иммерсионного масла и рассматривают с объективом 90х. Последовательность приготовления препарата «фиксированных клеток» представлена на рис. 1.1. Для получения

более чистых препаратов краситель наливают на мазок, покрытый фильтровальной бумагой. Метод окрашивания в модификации Синева позволяет вместо использования растворов красителя применять фильтровальную бумагу, заранее пропитанную красителем. В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения светлое и чистое, окрашены только клетки микроорганизмов. Фиксированные окрашенные препараты могут храниться длительное время.

Контрольные вопросы:

1. Какие условия необходимо создать для выращивания микроорганизмов?
2. Каким общим требованиям должна отвечать любая питательная среда?
3. Как классифицируются питательные среды?
4. Охарактеризуйте естественные и искусственные питательные среды?
5. Что такое элективные и дифференциально-диагностические среды?
6. Дать классификацию питательных сред по консистенции.
7. Какие стандартные среды используют для выращивания бактерий, дрожжей и плесневых грибов?
8. Как готовят плотные среды?
9. Что такое желатина и агар?
10. Какая температура плавления и затвердевания сред с агаром и желатиной?

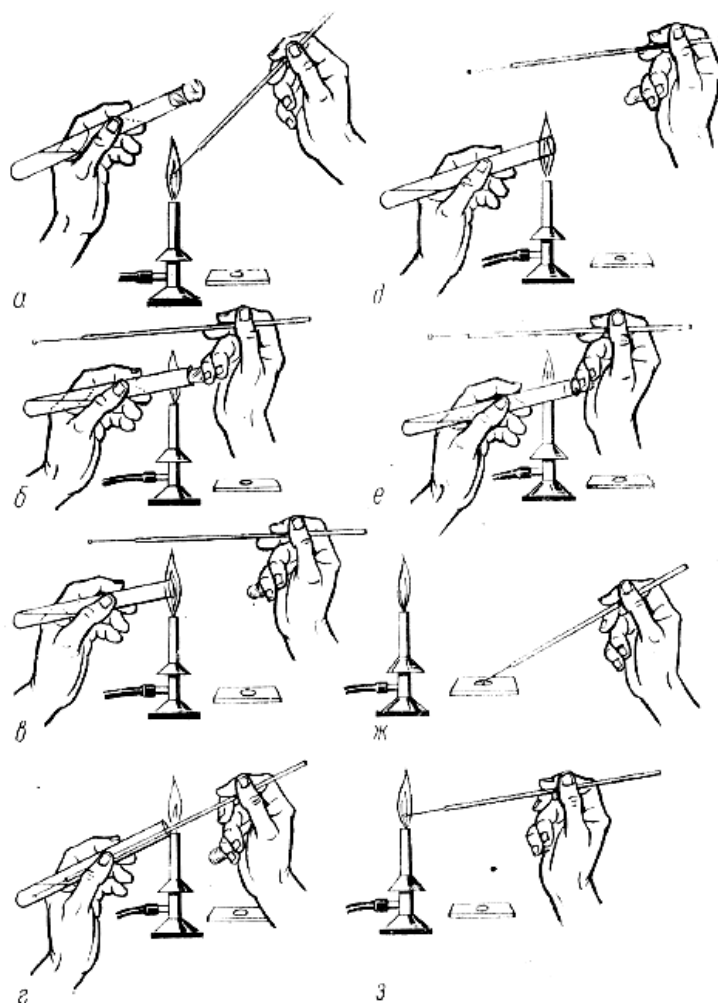


Рис. 1.1 – Последовательность приготовления препарата «фиксированных клеток»

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2. ПОСЕВЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: Ознакомиться с видами посевов микроорганизмов.

2.1. Теоретические сведения

Рост на плотных питательных средах

На поверхности плотных питательных сред микроорганизмы могут расти в виде колонии, штриха или сплошного газона. Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросшее в большинстве случаев из одной клетки. В зависимости от того, где развивались клетки (на поверхности плотной питательной среды, в толще её или на дне сосуда), различают поверхностные, глубинные и донные колонии. Колонии, выросшие на поверхности среды, отличаются большим разнообразием и являются наиболее существенной особенностью роста микроорганизмов на плотном субстрате. При их описании учитывают следующие признаки:

✓ *форму колонии* (рис. 2.1) – круглая (а), круглая с фестончатым краем (б), круглая с валиком по краю (в), ризоидная (г, д), с ризоидным краем (е), амёбовидная (ж), нитевидная (з), складчатая (и), неправильная (к), концентрическая (л), сложная (м).

✓ *размер (диаметр) колонии* – измеряют в мм, если размер колонии не превышает 1 мм, то её называют точечной.

✓ *поверхность колонии* – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная.

✓ *профиль колонии* – плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и т.д. (рис. 2.2).

✓ *блеск и прозрачность* – колония блестящая, матовая, тусклая, мучнистая, прозрачная.

✓ *цвет колонии* – бесцветная (грязно-белые колонии относятся к бесцветным) или пигментированная – белая, желтая, золотистая, оранжевая, сиреневая, красная, черная. Особо отмечают выделение пигментов в субстрат. При описании колоний актиномицетов отмечают пигментацию воздушного и субстратного мицелия, а также выделение пигментов в среду.

✓ *край колонии* – ровный, волнистый, зубчатый и т.д. (рис. 2.3).

✓ *структура колонии* – однородная, струйчатая и т.д. (рис. 2.4).

Консистенцию колонии определяют, прикасаясь к её поверхности петлёй. Колония может легко сниматься с агара, быть плотной, мягкой или врастающей в агар, слизистой (прилипает к петле), тягучей, пленчатой (снимется целиком), хрупкой (легко ломается при прикосновении петлёй).

Глубинные колонии, напротив, довольно однообразны. Чаще всего они похожи на более или менее сплюсненные чечевички, в проекции имеющие форму овалов с заостренными концами. Лишь глубинные колонии немногих бактерий напоминают пучки ваты с нитевидными выростами в питательную среду. Образование глубинных колоний часто сопровождается разрывом плотной среды, если развивающиеся микроорганизмы выделяют углекислоту или другие газы.

Донные колонии самых разнообразных микроорганизмов имеют вид тонких прозрачных пленок, стелющихся по дну.

Размеры и некоторые другие особенности колоний изменяются с возрастом и зависят от состава среды, поэтому при их описании указывают на возраст культуры, состав среды и температуру культивирования.

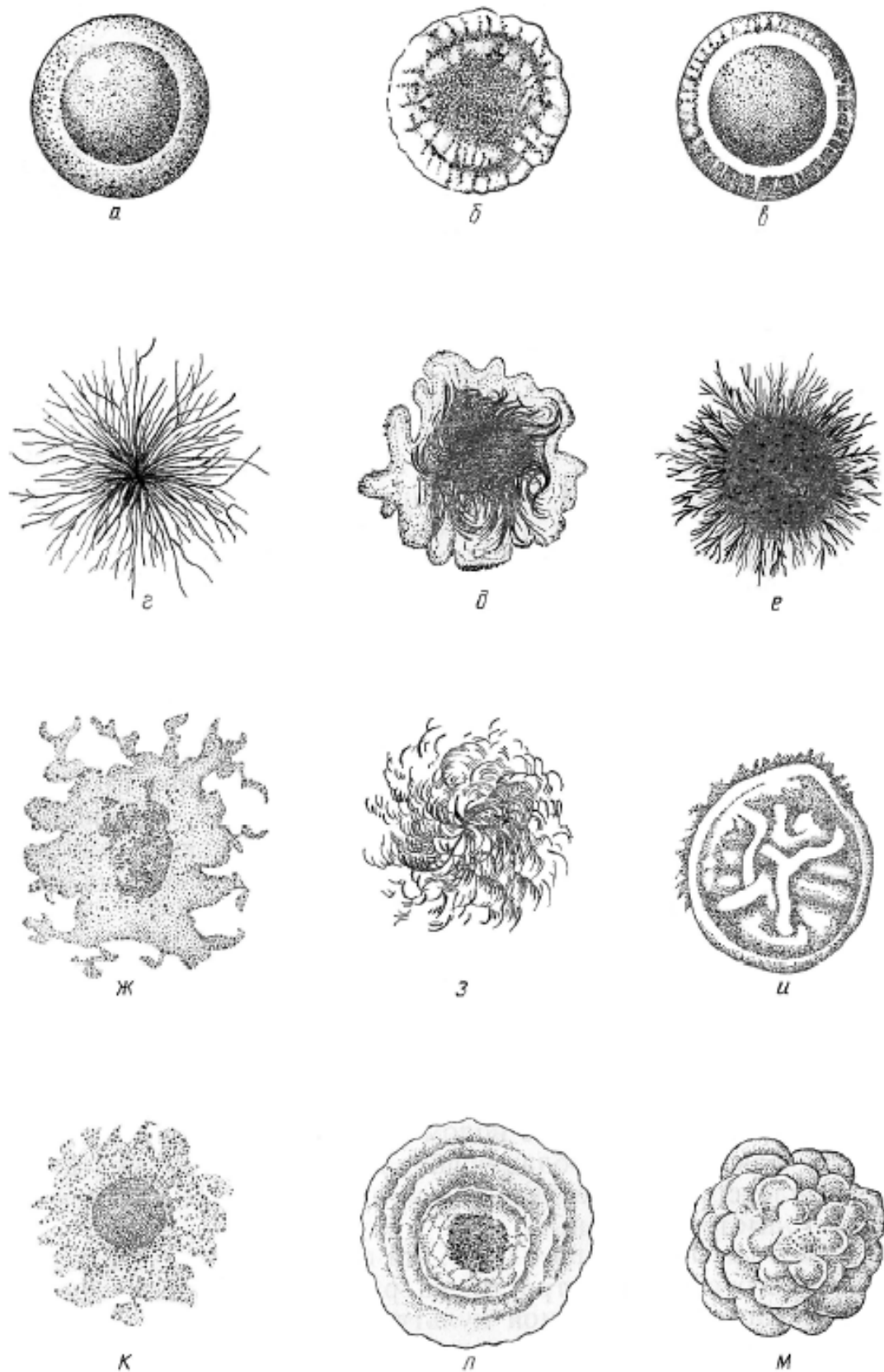


Рис. 2.1 – Форма колонии

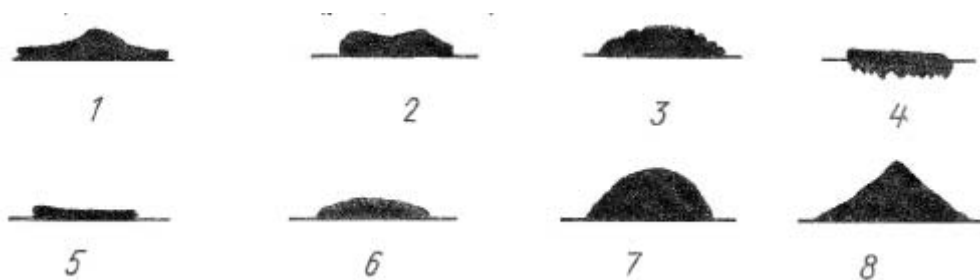


Рис. 2.2 – Профиль колонии:

1 – изогнутый; 2 – кратерообразный; 3 – бугристый; 4 – врастающий в агар;
5 – плоский; 6 – выпуклый; 7 – каплевидный; 8 – конусовидный

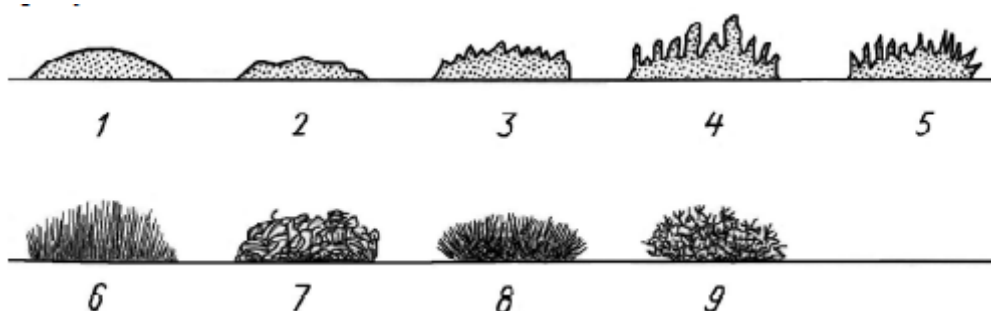


Рис. 2.3 – Край колонии:

1 – гладкий; 2 – волнистый; 3 – зубчатый; 4 – лопастной; 5 – неправильный;
6 – реснитчатый; 7 – нитчатый; 8 – ворсинчатый; 9 – ветвистый

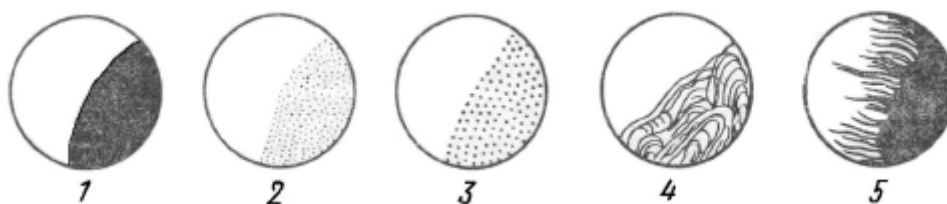


Рис. 2.4 – Структура колонии:

1 – однородная; 2 – мелкозернистая; 3 – крупнозернистая; 4 – струйчатая;
5 – волокнистая

Рост микроорганизмов в жидких средах

Рост микроорганизмов в жидких средах более однообразен и сопровождается помутнением среды, образованием пленки или осадка. Характеризуя рост в жидкой среде, отмечают степень помутнения – слабая, умеренная или сильная; особенности пленки – тонкая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая, а при образовании осадка указывают – скудный он или обильный, плотный, рыхлый, слизистый или хлопьевидный.

Нередко рост микроорганизмов сопровождается появлением запаха, пигментацией среды, выделением газа. Последнее обнаруживают по образованию пены, пузырьков, а также с помощью «поплавков» – маленьких запаянных с одного конца трубочек. Поплавок помещают в пробирку запаянным концом вверх перед стерилизацией среды и следят, чтобы он полностью был заполнен средой. В случае выделения газа он скапливается в поплавке в виде пузырька.

Для описания характера роста в жидких средах микроорганизмы выращивают на мясопептонном бульоне или на другой среде, обеспечивающей хороший рост этого микроорганизма. Чаще всего используют 4–7-суточные культуры.

2.2. Экспериментальная часть

Порядок выполнения работы:

1) Рассмотреть колонии бактерий и грибов, отмечая размер, форму, строение наружного края, характер поверхности, цвет колонии, мицелия грибов и органы размножения.

2) После визуального осмотра приступают к микроскопическому изучению грибов и бактерий. Для изучения бактерий используют препарат «фиксированных клеток», грибов – препарат «раздавленная капля» (Л/р №1). Следует помнить, что вегетативный мицелий большинства видов грибов не окрашен. Пигментирован только плодоносящий мицелий. Поэтому молодые колонии – белые или сероватые. По мере развития органов плодоношения колонии приобретают окраску. Для приготовления препарата «раздавленная капля» отбирают небольшой кусочек мицелия вместе с плодоносящими гифами у края колонии, на границе пигментированной и неокрашенной части колонии.

3) Микроскопировать препарат грибов сначала с объективом 8х, затем 40х, препарат бактерий – с иммерсионным объективом 90х.

4) При микроскопировании необходимо определить: у грибов – строение мицелия и плодоносящих гиф, форму и строение спор (конидий); у бактерий – форму, наличие спор.

5) Зарисовать изображения грибов и бактерий.

Контрольные вопросы:

1. Какой бывает форма колонии?
2. Какие колонии называют точечными?
3. Как определяют консистенцию колонии?
4. Чем сопровождается рост микроорганизмов в жидких средах?
5. Как можно обнаружить выделение газа микроорганизмов?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

САМООЧИЩЕНИЕ ВОДОЕМОВ. ЗОНЫ САПРОБНОСТИ

Цель работы: изучить процессы самоочищения водоемов, познакомиться с методикой биотестирования водоемов, выявить комплексы инфузорий, определяющие степень сапробности водоема.

3.1. Теоретические сведения

Биологический метод оценки степени загрязнения природных вод был разработан в 1902 г. немецкими исследователями Кольквитцем (ботаник) и Марссоном (зоолог).

У них были предшественники, которые указывали на приуроченность определенных организмов к загрязненным водам, но стройную систему предложили именно эти два автора, проделавшие огромную предварительную работу. Они исследовали свыше 800 различных водоемов: от чистых высокогорных озер до сточных коллекторов – и разделили их на три категории или ступени, в соответствии с процессами, протекающими в водоеме при естественном самоочищении.

1. Сильно загрязненные воды с резким преобладанием восстановительных процессов – *полисапробная зона* (гр. *poly* много, *sapros* гнилой).

2. Воды, в которых восстановительные процессы прекратились и начались окислительные, с постепенным преобладанием последних – *мезосапробная зона* (гр. *mesos* средний).

3. Воды, в которых наблюдается полное окисление поступавшего органического вещества – *олигосапробная зона* (гр. *oligos* незначительный).

Позднее мезосапробную зону разделили на две:

- α -мезосапробную, более загрязненную, близкую к полисапробной,
- β -мезосапробную, приближающуюся к олигосапробной.

Затем была введена еще *катаробная зона* (гр. *katharos* чистый), под которой подразумевалась абсолютно чистая вода, не содержащая органических веществ.

Таким образом, была создана *система из 5 зон или степеней сапробности, характеризующая процесс самоочищения от крайней степени загрязнения до постепенно возрастающей чистоты воды.*

В каждой из зон сапробности развивается присущий ей комплекс животных и растительных организмов, способных существовать в данных условиях, которые и были названы авторами этой системы *сапробными организмами* или *сапробионтами*.

Таким образом, по составу и количеству сапробионтов можно установить степень загрязнения того участка водоема, в котором они обитают.

Кольквитц и Марссон на основании своих исследований составили списки показательных организмов для каждой из зон сапробности, выделив около 1000 *организмов-индикаторов*. Они же одновременно являются и активными агентами самоочищения вод.

Эта система является экологической, так как рассматривает флору и фауну водоемов в тесной связи с условиями окружающей среды.

Поступающие в водоем загрязнения в результате самоочистительной способности водоемов постепенно разбавляются и разрушаются. Деструкция загрязнений протекает постепенно и в связи с этим постепенно восстанавливаются в водоеме условия, которые были в нем до поступления сточных вод. Процесс этот весьма длительный, и зона загрязнения в реке может захватывать десятки и сотни километров. Размер зоны зависит от соотношения объема сточных и речных вод, концентрации и качества загрязняющих веществ, скорости течения и других причин.

В зависимости от того, насколько сильно загрязнен водоем и насколько в нем прошли процессы самоочищения, водоемы и их отдельные участки подразделяются на зоны (табл. 3.1).

При загрязнении водоема в нем изменяются физико-химические условия. При этом одни формы гидробионтов погибают, другие получают преимущества для свободного развития, и в результате происходит смена биоценоза на загрязненном участке. Многие гидробионты способны развиваться только в воде определенного качества, и поэтому обнаруживают четко выраженную приспособленность к определенным зонам загрязнения.

Полисапробная зона (р) характеризуется большим содержанием нестойких органических веществ и наличием продуктов их анаэробного распада. В воде в изобилии присутствуют белковые вещества. БПК (биологическое потребление кислорода) составляет десятки миллиграммов на литр. Фотосинтез отсутствует. Кислород может поступать в воду только за счет атмосферной реаэрации, и так как он полностью потребляется на окисление в поверхностных слоях, то в воде он практически не обнаруживается. Вода содержит метан и сероводород.

Таблица 3.1 – Уровни сапробности и трофности вод

Уровень сапробности	Степень трофности	Ведущие организмы из числа инфузорий
Полисапробный: очень сильное органическое загрязнение, мало кислорода, много бактерий; видовой состав беден, численность особей высокая	Политрофная: очень большой избыток питательных веществ (гниющие воды)	<i>Caenomorphia, Colpidium, Epalxella, Lacrymaria, Metopus, Vorticella</i>
α-мезосапробный: значительное органическое загрязнение, мало кислорода, видовой состав богат, численность особей высокая	Эвтрофная: много питательных веществ, много фотосинтезирующих протистов	<i>Carchesium, Chilodonella, Paramecium, Urocentrum</i>
β-мезосапробный: слабое органическое загрязнение, много кислорода; видовой состав богат		<i>Euplotes, Halteria, Spirostomum, Stentor</i>
Олигосапробный: чистая, богатая кислородом вода; видовой состав беден, численность особей низкая	Олиготрофная: мало питательных веществ	<i>Dileptus, Strobilidium, Thuricola</i>

Для этой зоны характерно наличие большого числа сапрофитной микрофлоры, представленной сотнями тысяч и даже миллионами клеток в 1 мл. В донных отложениях кислород отсутствует, содержится много органического

детрита, протекают восстановительные процессы, железо находится в форме FeS. Ил имеет черную окраску с запахом сероводорода. В этой зоне в массе развиваются растительные организмы с гетеротрофным типом питания: сапрофитные бактерии, нитчатые бактерии, серные бактерии, из простейших – инфузории, бесцветные жгутиковые (рис. 3.1).

Альфа-мезосапробная зона ($\alpha - m$). В этой зоне начинается аэробный распад органических веществ с образованием аммиака, содержится много свободной углекислоты, кислород присутствует в малых количествах. Метан и сероводород отсутствуют. Количество загрязнения, определяемого по БПК, все еще очень велико: десятки миллиграммов на литр. Количество сапрофитных бактерий составляет десятки и сотни тысяч в 1 мл.

В воде и донных отложениях протекают окислительно-восстановительные процессы; железо трехвалентное и двухвалентное, ил сероватой окраски. В $\alpha - m$ зоне развиваются организмы, обладающие большой выносливостью к недостатку кислорода и большому содержанию углекислоты. Преобладают растительные организмы с гетеротрофным и миксотрофным питанием. Отдельные организмы имеют массовое развитие. Обильно развиваются нитчатые бактерии, грибы, водоросли. Из животных организмов обильны обрастания сидячими инфузориями (Carchesium), встречаются коловратки, много окрашенных и бесцветных жгутиковых (рис. 3.2).

Бета-мезосапробная зона ($\beta - m$) отмечается в водоемах, почти освободившихся от нестойких органических веществ, распад которых дошел до образования окисленных продуктов (полная минерализация).

Количество сапрофитных бактерий составляет тысячи клеток в 1 мл и резко увеличивается в период отмирания водной растительности. Концентрация кислорода и углекислоты сильно колеблется в течение суток, в дневные часы содержание кислорода в воде доходит до пресыщения, и углекислота может полностью исчезать. В ночные часы наблюдается дефицит кислорода в воде.

В иле много органического детрита, интенсивно протекают окислительные процессы, ил желтой окраски.

В этой зоне большое разнообразие животных и растительных организмов. В массе развиваются растительные организмы с автотрофным питанием, наблюдается цветение воды многими представителями фитопланктона. В обрастаниях обычны зеленые нитчатки и эпифитные диатомеи; в иле – черви, личинки хирономид, моллюски (рис. 3.3).

Олигосапробная зона (o) характеризует практически чистые водоемы с незначительным содержанием нестойких органических веществ и небольшим количеством продуктов их минерализации.

Содержание кислорода и углекислоты не претерпевает заметных колебаний в дневные и ночные часы суток. Цветение водорослей, как правило, не наблюдается. В донных отложениях содержится мало органического детрита, автотрофных микроорганизмов и бентосных животных (червей, личинок хирономид и моллюсков).

Показателями большой чистоты воды в этой зоне являются некоторые красные водоросли и водные мхи (рис. 3.4).

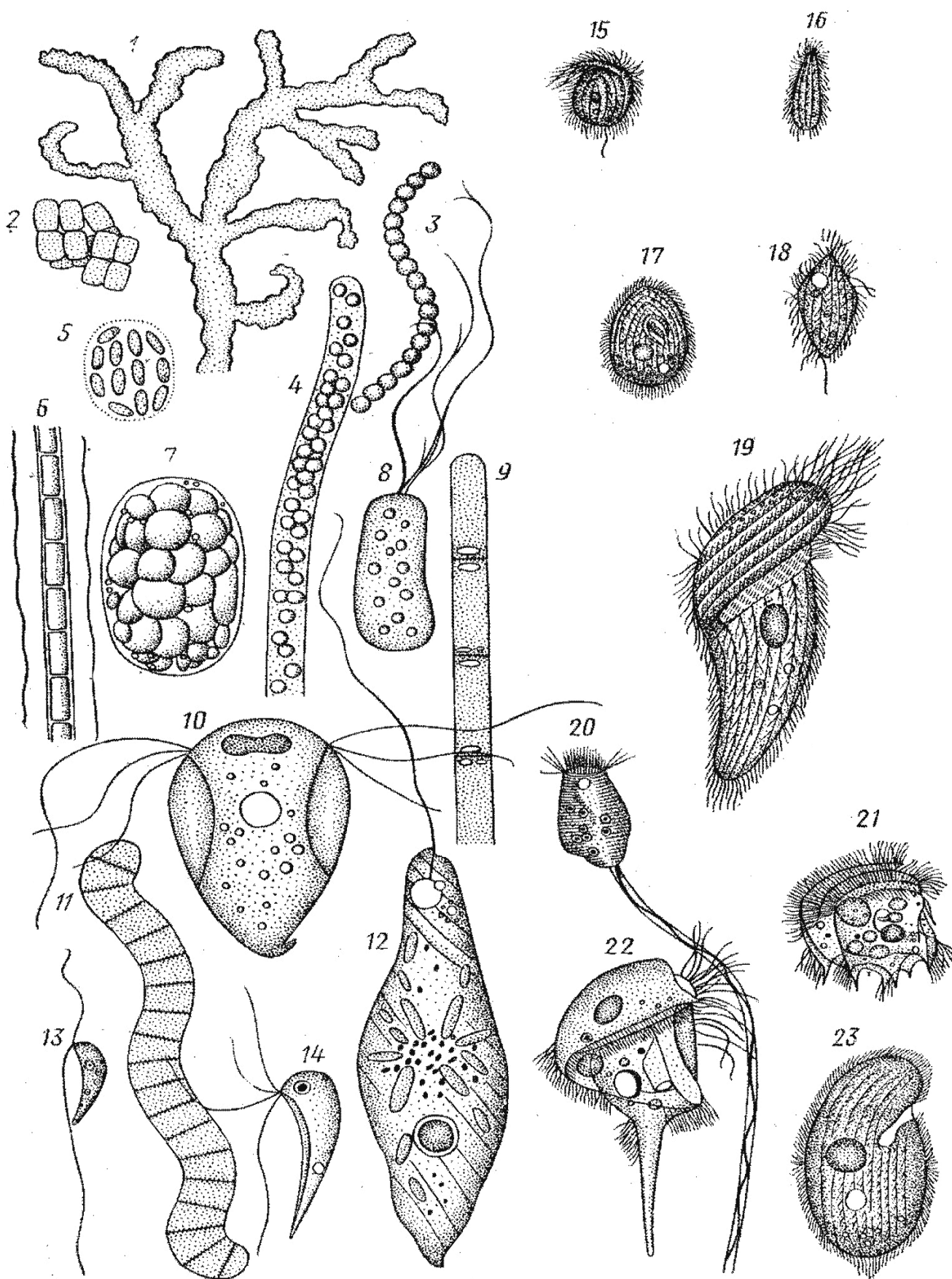


Рис. 3.1 – Организмы полисапробной зоны:
 1–11 – нитчатые бактерии;
 12–14 – жгутиконосцы; 15–23 – инфузории

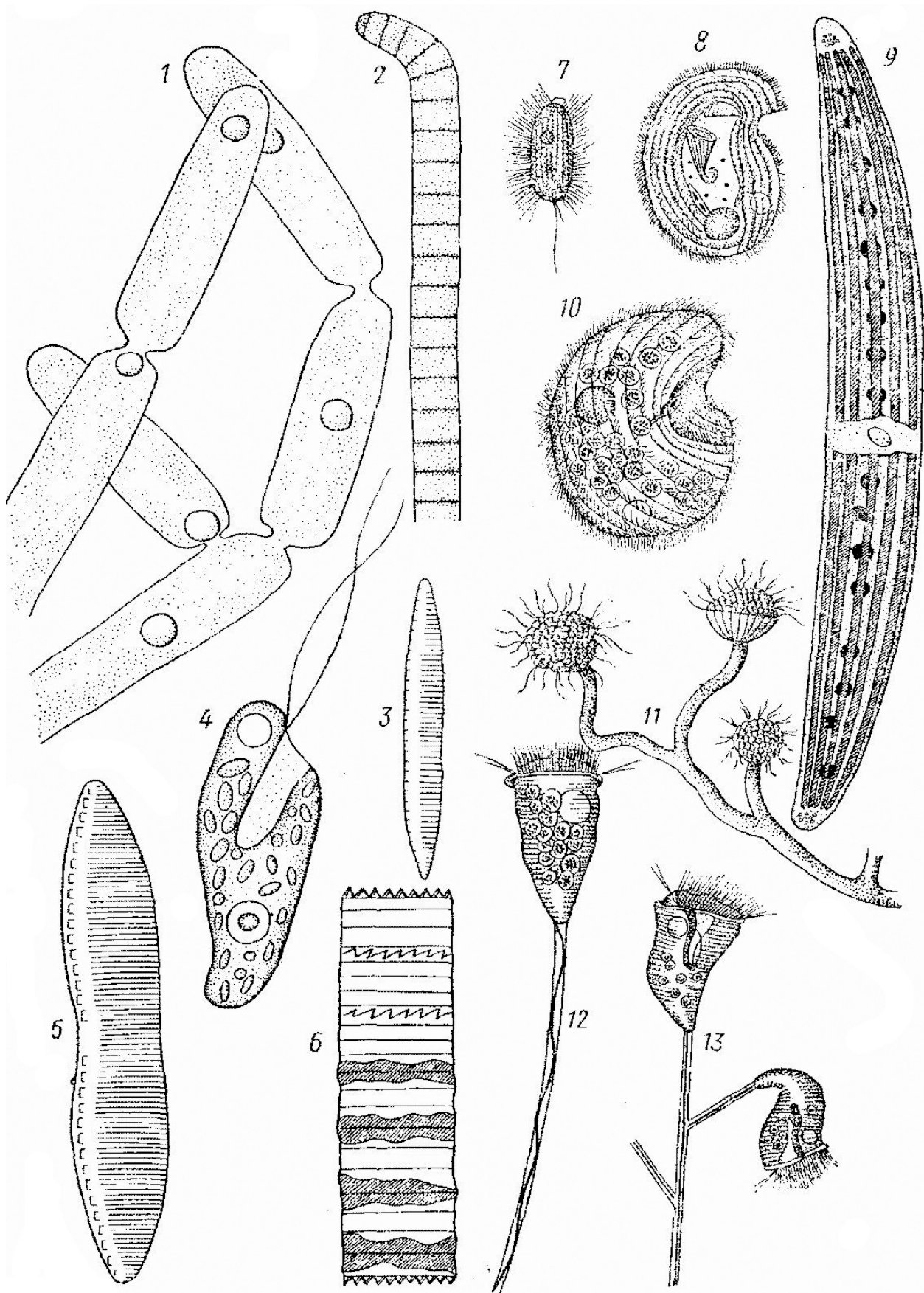


Рис. 3.2 – Альфа-мезосапробные организмы:
 1–3 – бактерии; 4 – одноклеточная водоросль;
 5–6 – многоклеточные водоросли; 7–13 – инфузории

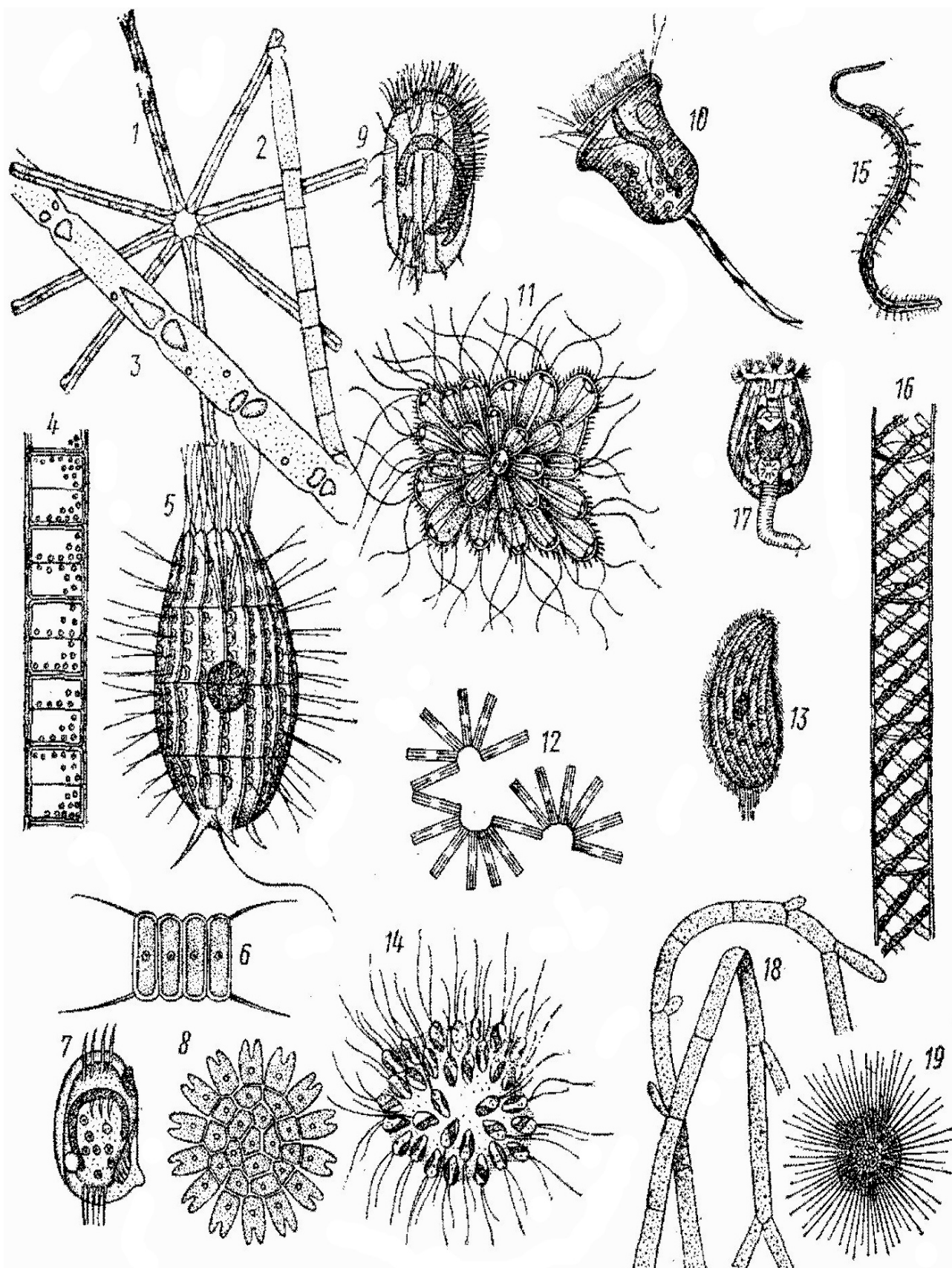


Рис. 3.3 – Бета-мезосапробные организмы:
 1–3 – нитчатые бактерии; 4 – зеленые водоросли;
 5–6 – водоросли; 7–8 – жгутиковые; 9–10 – инфузории; 11–12 – водоросли;
 15 – кольчатые черви; 18–19 – грибы

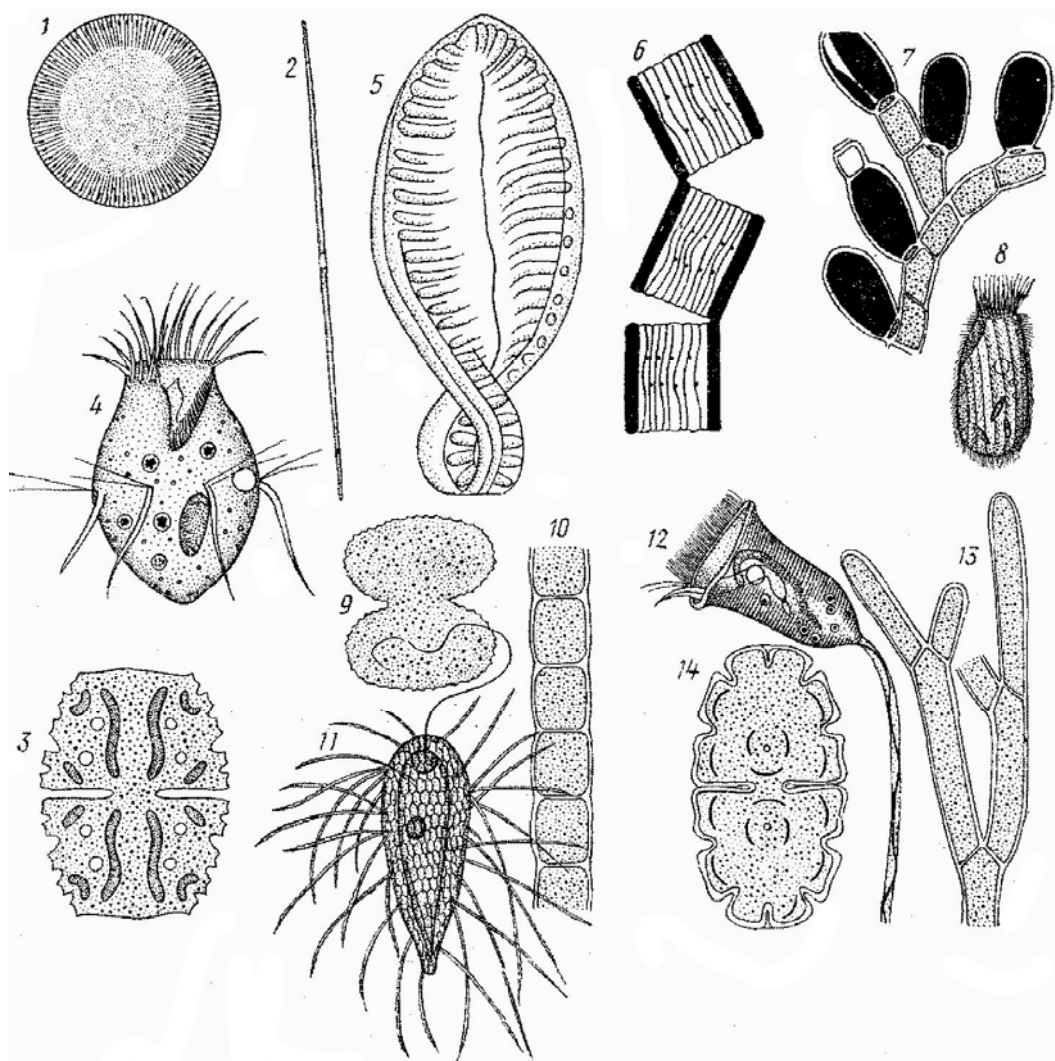


Рис. 3.4 – Олигосапробные организмы:
1, 2, 3, 6, 10, 13, 14 – водоросли; 4, 8, 12 – инфузории;
7 – кишечнополостные; 11 – личинка

По мере развития процесса биологического самоочищения возрастает видовое разнообразие, но численность каждого отдельного вида уменьшается:

- в олигосапробной зоне разнообразие видов достигает максимума, зато численность отдельных видов невелика;
- для полисапробной зоны характерны небольшое число видов и очень высокая численность каждого отдельного вида.

Система сапробных организмов полностью отвечает экологическому принципу Тинеманна: «Чем больше условия существования данного местообитания отличаются от оптимальных для большинства видов, тем беднее по видовому разнообразию становится биоценоз и тем характернее и многочисленнее – каждый отдельный вид».

Система Кольквитца и Марссона сразу получила широкое распространение и была использована для оценки санитарного состояния водоемов, особенно в Европе и России. В нашей стране создалась школа санитарных гидробиологов (Я. Я. Никитинский, Г. И. Долгов, С. Н. Строганов, С. М. Вислоух и др.), успешно применявших и развивавших **систему санитарно-биологического анализа**, т.е. состояние водоема определялось на основе животных и растительных организмов.

Кольквитц и Марссон подчеркивали, что основное значение следует придавать не отдельным видам, а биоценозам, т.е. сообществу показательных организмов.

Очень чистые водоемы практически не несут следов воздействия человека. В России, например, к таким водоемам могут быть отнесены многие озера и реки Сибири, севера Дальнего Востока, а на европейской территории – Ладожское и Онежское озера, Рыбинское водохранилище, некоторые северные реки. В этих водоемах насыщение воды кислородом достигает 95%, БПК не превышает 1 мг/л, а взвешенные вещества – 3 мг/л. Вода в очень чистых водоемах пригодна для всех видов водопользования.

Водоемы, относимые к категории *чистых*, по химическим показателям почти не отличаются от очень чистых, но следы влияния деятельности человека проявляются, прежде всего, в увеличении количества сапрофитной микрофлоры в воде. Воды водоемов второго класса также пригодны для всех видов водопользования.

Умеренно загрязненные воды характеризуются повышенным содержанием органических веществ, ионов хлора и солей аммония. Они несут в себе признаки загрязнения поверхностным стоком и бытовыми водами. Умеренно загрязненные воды после соответствующей очистки пригодны для хозяйственно-питьевого использования, разведения некоторых видов рыб и для прочих видов водопользования.

К категории *загрязненных* отнесены реки и озера, природные свойства которых значительно изменены в результате поступления в них сточных вод. В зимний период при образовании ледяного покрова на загрязненных участках водоема могут создаваться анаэробные условия. Загрязненные воды не пригодны для питьевого, хозяйственно-бытового и спортивного назначения, а также для рыбоводства. Они могут быть использованы, да и то с ограничениями, в некоторых производственных процессах, для орошения и судоходства. В странах Западной Европы, при остром дефиците воды, загрязненные воды используют для хозяйственно-питьевого назначения, применяя при этом сложные способы очистки.

В *грязных и очень грязных водоемах* природные свойства воды сильно изменены. В летний период вода этих водоемов издает неприятные запахи. Повышенное содержание агрессивной углекислоты и сернистых соединений в воде грязных водоемов оказывает вредное воздействие на обшивку судов и портовые сооружения, вследствие чего эти водоемы ограниченно пригодны для судоходства. Для орошения воды грязных водоемов могут быть использованы с ограничениями, не под все культуры.

Для оценки степени загрязнения водоема необходимо пользоваться средними данными, собранными в период наиболее критического состояния водоема. Например, наименьшая концентрация растворенного кислорода наблюдается летом или в период ледостава, температура наиболее высокая – летом. По многим показателям наиболее неблагоприятные условия создаются зимой. Показатели в этот период и принимаются за основу при оценке степени загрязненности водоема.

3.2. Экспериментальная часть

Задание: провести сравнительный анализ проб воды, взятой из разных природных водоемов. Выявить доминирующие виды простейших. Сделать заключение об антропогенных факторах, определяющих качество воды.

Материалы и оборудование: предметные стекла, покровные стекла, пипетки, бюксы с образцами воды из водоемов, 0,1% раствор желатина, вата, микроскоп.

Ход работы:

1. На предметное стекло нанести каплю воды, взятую из природного водоема.
2. Для замедления движения простейших в каплю воды добавить небольшую каплю раствора желатина и накрыть покровным стеклом.
3. Поместить препарат на предметный столик микроскопа, используя винты предметного столика постепенно перемещать препарат и регистрировать виды простейших.
4. Определение видов производить по описаниям инфузорий (Л/р №2), фотографиям (прил. А).
5. Провести микроскопирование проб воды из разных природных водоемов, подверженных в различной степени антропогенному воздействию.
6. Заполнить табл. 3.2.

Форма отчетности: представить тетрадь с описанием индикаторных организмов, заполненной табл. 3.2 и заключением о степени сапробности водоема для каждого образца.

Таблица 3.2 - Сапробность природных водоемов по видовому составу инфузорий

Природный водоем	Равноресничные инфузории		Кругоресничные инфузории		Спирально-ресничные инфузории		Зона сапробности
	виды	числен.	виды	числен.	виды	числен.	
1.	1. 2. 3. и др.						

Контрольные вопросы:

1. Опишите уровни сапробности и трофности природных вод.
2. Чем характеризуется полисапробная зона?
3. Чем характеризуется олигосапробная зона?
4. Чем характеризуется мезосапробная зона?
5. Чем характеризуется катаробная зона?
6. Какие микроорганизмы доминируют в каждой из сапробных зон?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4

САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Цель работы: провести санитарно-бактериологическое исследование проб воды из различных источников и оценить возможность ее использования для питьевых целей.

4.1. Теоретические сведения

4.1.1. Цели и задачи санитарно-микробиологического исследования воды

Поскольку вода используется при производстве любого вида продукции, а также непосредственно в пищу, соответствие ее качества санитарно-микробиологическим показателям чрезвычайно важно. Водным путем могут передаваться кишечные инфекции – холера, брюшной тиф и паратифы, сальмонеллез, дизентерия, гепатит А, полиомиелит, а также лептоспирозы, сибирская язва, туляремия, туберкулез, сепсис, Ку-лихорадка, различные грибковые заболевания. В связи с этим основной целью санитарно-микробиологического исследования воды является определение наличия в ней патогенной и условно-патогенной микрофлоры, и, следовательно, источника этого попадания, а также предупреждение распространения инфекционных заболеваний среди населения.

Санитарно-микробиологическое исследование воды проводится в следующих случаях:

- 1) при выборе источника централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения и периодическом контроле этого источника;
- 2) при контроле эффективности обеззараживания питьевой воды централизованного водоснабжения;
- 3) при наблюдении за подземными источниками централизованного водоснабжения, за такими как артезианские скважины, почвенные воды и т.д.;
- 4) при определении состояния и степени пригодности воды источников индивидуального водопользования (колодцев, родников и т.д.);
- 5) при наблюдении за санитарно-эпидемиологическим состоянием воды открытых водоемов: водохранилищ, прудов, озер, рек;
- 6) при контроле эффективности обеззараживания воды плавательных бассейнов;
- 7) при проверке качества и степени очистки сточных вод;
- 8) при определении очага водных вспышек инфекционных болезней.

Все санитарно-микробиологические исследования воды регламентируются соответствующей нормативно-технической документацией (НТД) (табл. 4.1).

Таблица 4.1 – Перечень нормативно-технической документации по санитарно-микробиологическому контролю воды

<i>Названия документов</i>	<i>НТД</i>
Гигиенические требования к воде питьевой, предназначенной для потребления человеком	СанПиН 2.2.4-171-10
Источники централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения. Гигиенические, технические требования и правила выбора	ГОСТ 2761-84
Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа	ГОСТ 18963-73
Охрана природы. Гидросфера. Гигиенические требования к зонам рекреации водных объектов	ГОСТ 17.1.5.02-80

Продолжение табл. 4.1

Охрана природы. Гидросфера. Правила контроля качества морских вод	ГОСТ 17.1.3.08-82
Вода питьевая. Полевые методы санитарно-микробиологического анализа	ГОСТ 24849-81
Требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников	СанПиН 2.1.4.544-96

При санитарно-микробиологическом исследовании воды определяются различные показатели в зависимости от поставленной задачи и характера исследуемого объекта (табл. 4.2).

Таблица 4.2 – Ориентировочные показатели, контролируемые в воде из разных источников

<i>Объекты исследования</i>	<i>Обязательные исследования</i>	<i>Дополнительно рекомендуемые</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
Вода питьевая централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения	Число колоний сапрофитов БГКП	E. coli
Вода питьевая при нецентрализованном использовании местных источников	БГКП	
Вода подземных источников централизованного водоснабжения	Число колоний сапрофитов БГКП	E. coli
Вода поверхностных источников централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения в черте населенных пунктов	ЛКП	Число колоний сапрофитов E. coli; Энтерококки; Колифаги; Сальмонеллы; Шигеллы; Энтеровирусы
Вода в водных объектах в рекреации	ЛКП	Число колоний сапрофитов E. coli, Энтерококки; Колифаги; Стафилококки; Сальмонеллы; Шигеллы; Энтеровирусы
Вода купально-плавательных и спортивных бассейнов с пресной и морской водой	БГКП Число колоний сапрофитов Стафилококки	Энтеровирусы E. coli
Хозяйственно-бытовые сточные воды после очистки и обеззараживания	ЛКП	Сальмонеллы, Шигеллы, Энтеровирусы

4.1.2. Методы санитарно-микробиологического исследования воды

Отбор проб воды

Важным правилом является соблюдение стерильности: забор воды производят в стерильную посуду стерильными приборами и обязательно продезинфицированными (денатурированным этиловым спиртом или другим дезинфицирующим средством) руками.

Отбор проб воды выполняет санитарный врач, его помощник или специально проинструктированный сотрудник лаборатории. Достоверность получаемых результатов и выводов зависят от правильности забора проб. Вода для санитарно-бактериологического анализа забирается в объеме 0,5 л в

стеклянные бутылки или флаконы, закрытые ватно-марлевыми пробками и завязанные сверху бумажными колпачками. При необходимости исследования воды на присутствие возбудителей кишечных инфекций количество воды увеличивают до 2,5 л.

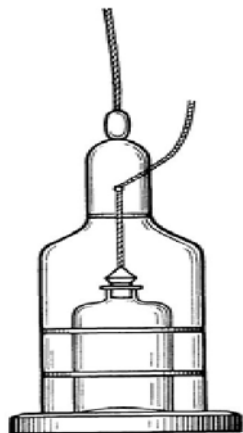


Рис. 4.1 – Батометр

Для взятия проб воды из глубины (открытых водоемов, колодцев, бассейнов и т.д.) используют специальные приборы: батометр, приборы Исаченко, Рутнера и др. Батометр представляет собой металлический каркас длиной 0,5-1 м (рис. 4.1). Каркас изготавливается из металла, не подвергающегося коррозии, и может компактно складываться, так как состоит из отдельных колец. Дно каркаса свинцовое и служит грузилом. Внутри устанавливают стерильную бутылку, закрытую стерильной резиновой или корковой пробкой с кольцом, к которому привязана веревка.

При погружении в воду на необходимую глубину, потягивая за веревку, пробку открывают, сосуд заполняется водой, о чем свидетельствует прекращение появления пузырьков воздуха на поверхности воды. Веревку опускают, бутылка автоматически закрывается. После извлечения батометра притертую пробку заменяют стерильной ватной (которая должна быть завернута в бумагу и находиться в комплекте с батометром). Для взятия проб с большой глубины (более 30 м) можно использовать приборы Исаченко, Рутнера, Романенко-Младова.

При отсутствии батометров пробу воды можно отбирать с помощью бутылки, в пробку которой монтируют две стеклянные трубки, соединенные резиновым шлангом. Одна трубка длинная и доходит до дна бутылки, другая - короткая. К резиновому шлангу привязывают веревку. Бутылку на тросе опускают в водоем и на заданной глубине, дернув за веревку, снимают резиновую перемычку со стеклянных трубок, вода начинает поступать в длинную трубку, а через короткую выходит воздух. После отбора пробы, бутылку вынимают из водоема, тут же закрывают ватными пробками отверстия стеклянных трубок и отправляют на исследование.

Для взятия проб питьевой воды используют склянки емкостью 0,5-1 л. При взятии проб воды из кранов, их предварительно обжигают пламенем горящего ватного тампона, смоченного спиртом, затем полностью открывают и в течение 10 мин воду спускают. Воду наливают в бутылки с соблюдением стерильности, не смачивая горлышко, чтобы не допустить замачивания пробки. Родниковую воду берут непосредственно из струи или из середины текущего родника, на расстоянии 10-15 см от поверхности и дна. Артезианскую и колодезную воду забирают на глубине 10-15 см от поверхности воды. Из проруби пробы отбирают на глубине 10-15 см от нижнего края льда. Из открытых водоемов, как правило, берут серию проб на разном удалении от берега на различной глубине с учетом места водозабора и движения воды.

Пробы сточных вод также забирают в стерильные бутылки. Однако объем каждой пробы может колебаться от 500 до 10 мл в зависимости от места взятия (при проверке отдельных этапов очистки, после обработки, перед сбросом в водоем) и от задач анализа.

Хранение и транспортировка проб воды

Все взятые для исследования пробы воды пронумеровываются, в сопроводительном документе должно быть указано: наименование водоема, водоисточника, его местонахождение; описание места отбора проб (для водоемов - расстояние от берега и глубина), близость источников загрязнения; быстрота течения; метеорологические условия – температура воды, воздуха, наличие осадков, ветра, волн и т.д.; дата взятия пробы (время, число, месяц, год); цель исследования. Сопроводительный документ подписывается лицом, бравшим пробу, с указанием его должности.

Транспортировать воду следует в сумках-холодильниках или в ящиках с термоизолирующей прокладкой (температура в которых не более 1-2°C), предохранять от резких толчков (чтобы не замочить пробки), замерзания, действия солнечных лучей.

Исследование воды должно быть проведено не позднее 2 ч с момента отбора пробы, лишь в виде исключения допускается хранение пробы до 6 ч при температуре 4-5°C. При более длительном и неправильном хранении может наступить размножение или гибель микрофлоры.

Доставленные пробы воды регистрируют в специальном журнале с пронумерованными и прошитыми страницами.

Определение числа сапрофитных микроорганизмов

К сапрофитным микроорганизмам, населяющим водоемы, относятся мезофильные аэробы и факультативные анаэробы, способные на питательной среде образовывать колонии, видимые при увеличении в 2-5 раз. Количество микроорганизмов, вырастающих в виде колоний, соответствует степени загрязнения воды органическими веществами, что характеризует состояние воды. Поэтому общее количество сапрофитных микробов следует рассматривать как существенный косвенный показатель санитарного состояния воды.

Определение общего микробного числа воды можно проводить методом серийных десятикратных разведений с посевом на мясопептонный агар (МПА) и методом прямого микроскопического подсчета микроорганизмов в исследуемой воде.

При определении первым методом посеvy выращивают в зависимости от цели исследования при температуре 37°C в течение 24 ч, или при 20-22°C – 48 ч, или при обоих температурных режимах параллельно. Например, при выборе нового источника водоснабжения определяют две группы сапрофитов: 1) вырастающих при температуре 20-22°C в течение 48 ч, 2) вырастающих при 37°C в течение 24 ч. При температуре 20°C вырастает большее количество сапрофитов и именно они являются наиболее активными участниками процесса самоочищения водоема. В местах большого загрязнения сточными водами численное значение обеих групп сапрофитов близко, поэтому динамика

численности этого показателя считается чувствительным индикатором загрязнения водоемов, особенно органическими веществами. При определении числа сапрофитов при двух температурных режимах делают параллельно каждый посев на 2 чашки Петри со средой (в двух повторностях). Объем воды для посева выбирают с таким расчетом, чтобы на чашках выросло не менее 20, но не более 300 колоний (табл. 4.3). Перед посевом пробы тщательно перемешивают, затем готовят 10-кратные разведения (при сильном загрязнении). Засев каждого разведения – в количестве 1 мл глубинным способом.

После инкубации (при 20 и 37⁰С) подсчитывают все колонии, выросшие как на поверхности среды, так и в глубине ее. При прямом подсчете с обратной стороны дна чашки карандашом по стеклу отмечают каждую подсчитанную колонию (чтобы не учесть ее дважды).

Если на агаре в чашках выросло много колоний (более 300) или они расплывчатые, а анализ нельзя повторить, то подсчет можно вести при помощи специальных камер или прибора для счета колоний (рис. 4.2). Этот прибор значительно облегчает подсчет, так как он ведется с помощью лупы, дающей увеличение колоний в 2 раза, что ускоряет работу и упрощает процесс определения количества колоний. Аппарат состоит из металлического корпуса, на верхней части которого находится круглая пластинка из термостойкого матового стекла с нанесенной на нем сеткой.

Таблица 4.3 – Схема посева воды из различных объектов методом мембранных фильтров и прямым посевом

Объект исследования	Объем засеваемой воды (в миллилитрах) для определения		
	сапрофитов	БГКП, ЛКП, E. coli	энтерококков
Вода питьевая централизованного водоснабжения	1; 0,1	200;133 или 300 100, 30, 3	500 или 333
Водные объекты, не загрязняемые сточными водами	1; 0,1 или 1; 0,1; 0,01	40, 10, 1	50, 10
Водные объекты, загрязненные сточными водами	1; 0,1; 0,01 или 0,1; 0,1; 0,001	10; 1; 0,1 или 1; 0,1; 0,01	10, 1, 0,1
Сточные воды до очистки и обеззараживания	От 0,001 до 0,000 001	От 0,01 до 0,000001 или от 0,001 до 0,000001	От 0,1 до 0,0001 или от 0,01 до 0,000001
Сточные воды после очистки	От 0,01 до 0,00001	От 1 до 0,00001 или от 1 до 0,0001	От 1 до 0,00001

Под стеклом вмонтирована электрическая лампочка, которая освещает сетку. Чашка с посевом, помещенная на стекло, снизу подсвечивается.

Подсчет колоний ведется с помощью электропера авторучки, соединенной с автоматическим счетчиком. При каждом надавливании на ручку (в момент нанесения на обратной стороне дна чашки точки пером в месте нахождения колоний) при электроконтакте на автоматический счетчик поступает импульс, что регистрируется появлением очередной цифры на табло счетчика.

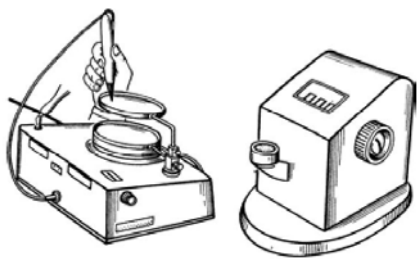


Рис. 4.2 – Прибор для счета колоний в чашках

Конечный результат – *ОМЧ* – рассчитывают по формуле:

$$ОМЧ = (K \cdot P) / V, \quad (4.1)$$

где *ОМЧ* – общее микробное число колонийобразующих единиц (КОЕ) микроорганизмов в 1 мл исследуемой воды; *K* – количество колоний на чашке Петри; *P* – фактор разведения; *V* – объем, засеваемый на чашку, мл.

Вычисляют среднеарифметическую величину для каждого разведения (при засеве на 2 и более чашки Петри параллельно). Если колоний выросло так много, что они не поддаются счету, или наблюдается рост расплывчатых колоний по всей поверхности агара, то в результате отмечают «сплошной ползучий рост».

Этот метод впервые был предложен в 1932 г. А.С. Разумовым. Сущность метода заключается в концентрации бактерий на мембранных фильтрах (при пропускании через них исследуемой воды), последующем окрашивании эритрозином и микроскопировании.

Прямой микроскопический метод определения общего количества микроорганизмов

Прямой метод удобен тем, что результат, т.е. количество микроорганизмов в 1 мл воды, может быть получен в течение нескольких часов.

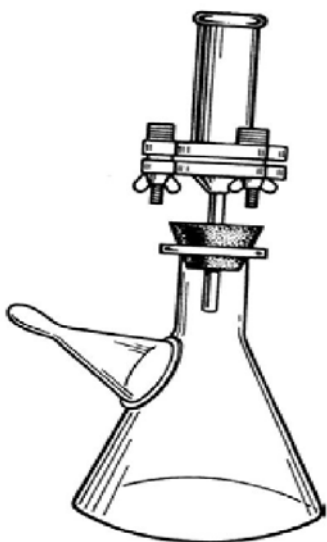


Рис. 4.3 – Фильтр Зейтца

Поэтому рекомендуется использовать прямой метод, если необходимо дать быструю санитарную оценку воды: при оценке процесса естественного самоочищения водоемов, при оценке эффективности работы очистных сооружений на всех этапах и т.д. Для фильтрации воды используют мембранные фильтры, фильтр Зейтца (рис. 4.3) или специальный аппарат Долгова-Разумова. Мембранные фильтры – тонкие (0,1-0,5 мм) круглые пластинки из нитроцеллючатки или ацетилцеллюлозы диаметром 35 мм. В зависимости от размера пор различают фильтры марки Ф (фильтрующие): № 1 – 350 нм; № 2 – 500 нм; № 3 – 700 нм; № 4 – 900 нм; № 5 – 1200 нм.

Фильтры с осевшими на них микроорганизмами высушивают, помещая на фильтровальную бумагу в чашках Петри в термостат или в сушильный шкаф, а затем окрашивают карболовым эритрозином (5 г эритрозина на 100 мл 5% раствора фенола). При окрашивании фильтры кладут нижней поверхностью в чашку Петри на фильтровальную бумагу, предварительно смоченную эритрозином, и выдерживают в течение 1 ч (можно до 18 ч) с закрытой крышкой. Окраска и последующая промывка препарата происходит через поры мембранного фильтра. Остатки эритрозина отмывают, помещая фильтр в чашку Петри на

фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой. Так делают 3-5 раз, перекладывая фильтр из одной чашки в другую на бумагу, смоченную дистиллированной водой, до тех пор пока бумага под фильтром не перестанет окрашиваться. После последней промывки поверхность фильтра остается розовой (за счет окрашенных бактерий), а края его становятся бледно-розовыми

Затем мембранный фильтр с окрашенными микроорганизмами высушивают и помещают на предметное стекло, предварительно капнув каплю иммерсионного масла на стекло и на фильтр, который накрывают тонким покровным стеклом. Микроскопируют с иммерсионным объективом, в окуляр вкладывают сетчатый микрометр, разделенный на мелкие квадраты. Подсчитывают микроорганизмы в 20 полях зрения (в каждом поле зрения в 4 маленьких квадратах, расположенных по диагонали). Расчет общего количества бактерий в 1 мл (X) ведется по формуле:

$$X = \frac{S \cdot N \cdot 10^6}{S_1 \cdot V}, \quad (4.2)$$

где S – фильтрующая площадь прибора, мм²; 10^6 – переводной коэффициент квадратных миллиметров в квадратные микрометры; N – среднее количество бактерий в одном квадрате; S_1 – площадь квадрата окулярного микрометра, мкм²; V – объем профильтрованной воды, мл.

Определение бактерий группы кишечных палочек

Понятие «*бактерии группы кишечных палочек*» включает различных представителей семейства Enterobacteriaceae: родов Escherichia, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella и др. По нормативной документации к БГКП относятся граммотрицательные, не образующие спор палочки, не обладающие оксидазной активностью, ферментирующие лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 37°C в течение 5-24 ч (приложение Б, табл. 1). По международной классификации такие микроорганизмы относят к *общим колиформным бактериям (ОКБ)*. Они попадают в окружающую среду, в том числе и в воду, с испражнениями человека и животных, поэтому обнаружение их свидетельствует о фекальном загрязнении и эпидемической опасности в отношении кишечных инфекций.

БГКП (ОКБ) можно определять двумя методами: методом мембранных фильтров и титрационным (бродильным) методом.

Исследование воды методом мембранных фильтров.

Метод основан на фильтрации установленного объема воды через мембранные фильтры, выращивании посевов на дифференциально-диагностической среде и последующей идентификации колоний по культуральным и биохимическим признакам.

Перед употреблением мембранные фильтры проверяют на отсутствие трещин, отверстий, пузырей и кипятят в дистиллированной воде в течение 10 мин (при этом нельзя допускать скручивания фильтров). Для полного удаления из фильтров остатков растворителей, которые применяются при их изготовлении, кипячение следует повторить 3-5 раз со сменой дистиллированной воды. Подготовленные таким образом фильтры сохраняются в банках с дистиллированной водой или в сухом виде. В день постановки опыта фильтры повторно стерилизуют кипячением в дистиллированной воде в течение 10 мин.

Фильтрацию производят с помощью специальных приборов или фильтра Зейтца (рис. 4.3). Перед посевом воды аппарат стерилизуют фламбированием. После остывания на фильтровальный столик, на котором расположена сетка, стерильным пинцетом помещают мембранный фильтр, прижимают его воронкой или металлическим цилиндром и плотно закрепляют специальными винтами. Отросток колбы, в которую фильтруется вода, с помощью резиновой трубки соединяют с водоструйным или масляным насосом для создания вакуума в приемном сосуде (около 0,25 атм).

Объем воды для посева выбирают с учетом таблицы 5.3, он должен быть таким, чтобы на фильтре выросло не более 30 изолированных колоний. *Рекомендуемый объем питьевой воды – 300 мл.* Исследуемую воду каждого объема фильтруют не менее чем через 2 фильтра.

В воронку или стакан наливают необходимые объемы воды, начиная с меньших, а затем большие, каждый раз меняя фильтры. Самый меньший объем воды – 1 мл – следует фильтровать через фильтр, предварительно смоченный стерильной водой. После фильтрования верхнюю часть прибора снимают и фильтр осторожно (при сохранении вакуума для удаления излишка влаги на фильтре) стерильным пинцетом переносят на среду Эндо в чашку Петри. Фильтр накладывают вверх поверхностью, на которой осели бактерии, избегая появления пузырьков воздуха между фильтром и средой. На одну чашку можно разместить 4 фильтра, под каждым на дне чашки следует надписать объем воды, номер пробы и число. Если вода мутная, то фильтрование ведется сразу через два фильтра: предварительный фильтр № 6 (для задержания крупных частиц) помещают на фильтр № 2. После фильтрования оба фильтра переносят на среду Эндо. Чашки с фильтрами помещают в термостат и инкубируют при температуре 37°C в течение 24 ч. При окончательном результате учитывают колонии, выросшие на обоих фильтрах.

При наличии в воде БГКП (ОКБ) на фильтрах появляется рост типичных для этих бактерий колоний: темно-красные с металлическим блеском или красные, розовые с красным центром, имеющие четкий отпечаток на обратной стороне фильтра. Бактерии из таких колоний окрашивают по Граму и микроскопируют. Окраску по Граму можно заменить на тест Греггера (приложение Б). С культурой грамотрицательных бактерий лактозоположительных колоний ставят оксидазный тест (приложение Б) для дифференциации бактерий семейства *Enterobacteriaceae* от *Pseudomonadaceae* (последние являются оксидазообразующими бактериями). Оставшуюся часть оксидазоотрицательной Гр(–) изолированной колонии засевают в пробирку с полужидкой лактозной средой и инкубируют при 37°C, 48 ч. При появлении кислоты и газа за более короткий промежуток времени, результат считают положительным.

Индекс ОКБ (БГКП) рассчитывают по формуле:

$$\text{индекс ОКБ(БГКП)} = \frac{K \cdot 1000}{V}, \quad (4.3)$$

где K – количество проверенных на принадлежность к ОКБ (БГКП) колоний на фильтрах; V – объем профильтрованной воды через фильтры, на которых велся учет.

Например, профильтровано по 100 мл в трех повторностях, на одном фильтре выросло 5 колоний, на другом - 2, на третьем - нет роста.

Индекс ОКБ будет равен: $[(5 + 2) \times 1000] : 300 = 23$ КОЕ (колонийобразующих единиц). Для перевода индекса в титр используют формулу (4.1), для рассмотренного случая: Титр = $1000 : 23 = 43,5$ мл. В соответствии с СанПиН, у воды питьевой индекс ОКБ должен быть не более 3.

Метод мембранных фильтров является современным, точным, менее трудоемким и более дешевым в сравнении с титрационным методом. Он удобен и тем, что позволяет концентрировать бактерии, содержащиеся в значительном объеме воды на небольшой поверхности фильтра. Однако одним из самых существенных недостатков метода является то, что этим методом выявляется меньшее количество бактерий в сравнении с титрационным. Для большей точности рекомендуется исследование воды проводить параллельно обеими методами.

Титрационный метод исследования воды.

Метод основан на накоплении бактерий после посева установленного объема воды в жидкую питательную среду, с последующим пересевом на дифференциально-диагностическую среду и идентификации колоний по культуральным и биохимическим тестам.

Объем засеваемой воды зависит от характера исследуемого объекта, но обязательно посев ведется в 2-3, а в некоторых случаях - в 5-ти повторностях.

Объемы воды выбирают с таким расчетом, чтобы в одном из разбавлений получить хотя бы один отрицательный результат (табл. 5.4).

Посев воды производится в глюкозопептонную среду (ГПС): 100 мл воды - в 10 мл концентрированной среды, 50 мл - в 15 мл концентрированной среды, 10 мл - в 1 мл также концентрированной среды; 1 мл и последующие разведения - в 10 мл глюкозопептонной среды нормальной концентрации. Большие объемы воды засеваются во флаконы или колбы, меньшие – в пробирки. Посевы инкубируют в термостате в течение суток при температуре 37°C.

Таблица 4.4 – Схема посева воды из различных объектов при работе титрационным методом

Объект исследования	Объемы засеваемой воды (в мл) для определения	
	БГКП, ЛПК, E. coli	энтерококков
Вода питьевая централизованного водоснабжения	3 повторности по 100, 10, 1	2 или 3 повторности по 100, 10, 1
Вода нецентрализованного водоснабжения и плавательных бассейнов	50, 5 повторностей по 10, 1 или 2 повторности по 100, 10, 1 и 0,1	2 или 3 повторности по 100, 10, 1
Водные объекты, не загрязняемые сточными водами	50, 5 повторностей по 10, 1 или 2-3 повторности по 10; 1; 0,1; 0,01	50, 5 повторностей по 10, 1 или 2-3 повторности по 10; 1; 0,1; 0,001
Водоемы, загрязняемые сточными водами	2-3 повторности по 1; 0,1; 0,01; 0,001 или 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001	2-3 повторности по 10; 1; 0,1; 0,01
Сточные воды до очистки и обеззараживания	От 0,01 до 0,000000001	От 0,1 до 0,00000001
Сточные воды после очистки и обеззараживания	От 0,1 до 0,00000001	От 0,1 до 0,000001

Из пробирок с посевами, в которых наблюдается помутнение (а также образование кислоты и газа), делают высев на сектора в чашки со средой Эндо. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37°C в течение 16-18 ч. При наличии на среде Эндо характерных для БГКП (ОКБ) колоний (красных с металлическим блеском) следует провести все тесты, перечисленные выше. Положительный ответ на наличие БГКП дается в том случае, если наблюдается рост характерных колоний, образованных оксидазоотрицательными, Гр(–) бактериями, сбрасывающих лактозу при 37°C с образованием кислоты и газа. Обращают внимание также на отпечаток, окрашенный в красный цвет, на среде после снятия изучаемой колонии. Таким образом, положительный ответ выдается через 40-42 ч. Так же, как и при определении БГКП методом мембранных фильтров, если на среде Эндо выросли лактозоотрицательные колонии (розовые, бесцветные, мелкие красные), то их принадлежность к БГКП (ОКБ) подтверждается отрицательной окраской по Граму, отрицательным оксидазным тестом, способностью ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре 37°C и отсутствием протеолитической активности (при посеве на среду Эндо с молоком).

Результат выражается в виде индекса (титра) БГКП или ОКБ, цифровое выражение которых определяют по таблице 4.5.

Таблица 4.5 – Расчет наиболее вероятного числа бактерий в 1 л воды

Число положительных результатов из 3 объемов			Индекс ОКБ (БГКП)	Титр ОКБ (БГКП)	Число положительных результатов из 3 объемов			Индекс ОКБ (БГКП)	Титр ОКБ (БГКП)
по 100 мл	по 10 мл	по 1 мл			по 100 мл	по 10 мл	по 1 мл		
0	0	0	< 3	> 333	3	0	0	23	43
0	0	1	3	333	3	0	1	39	26
0	1	0	3	333	3	0	2	64	16
1	0	0	4	250	3	1	0	43	23
1	0	1	7	143	3	1	1	75	13
1	1	1	11	91	3	1	2	120	8
1	2	0	11	91	3	2	0	93	11
2	0	0	9	111	3	2	1	150	7
2	0	1	14	72	3	2	2	210	5
2	1	0	15	67	3	3	0	240	4
2	1	1	20	50	3	3	1	460	2
2	2	0	21	48	3	3	2	1100	0,9
2	2	1	28	86	3	3	3	>1100	<0,9

Определение термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ)

Из всех бактерий, входящих в состав БГКП, наибольшее санитарно-показательное значение имеют микроорганизмы рода *Escherichia*. По способности расщеплять лактозу при температуре 37°C из БГКП (ОКБ) принято выделять Гр(–) бактерии, которые способны ферментировать лактозу при температуре 44,5°C. К ним относится *E. coli*, не растущая на цитратной среде. В соответствии с международной классификацией эту группу бактерий называют *термотолерантные колиформные бактерии – ТКБ*.

Число ТКБ характеризует степень фекального загрязнения воды водных объектов и косвенно определяет эпидемическую опасность в отношении возбудителей кишечных инфекций. ТКБ определяют теми же методами, как и БГКП (ОКБ), кроме последнего этапа идентификации, который проводится по ферментации лактозы на полужидкой питательной среде при 44,5°C. В случае роста на среде Эндо типичных лактозоположительных колоний, Гр(-), оксидазоотрицательных, способных ферментировать лактозу при 44,5°C, их учитывают как ТКБ, индекс или титр определяют по таблице 4.5.

Определение *E. coli*

Определение *E. coli* является дополнительным показателем для расшифровки происхождения биологической контаминации, определения свежести фекального загрязнения, при оценке качества воды в случае превышения норматива. Такое исследование проводится при периодических анализах воды, а также при неожиданных изменениях в основных показателях - индекса ОКБ, ТКБ.

Группа бактерий, условно обозначаемых как *E. coli*, включает лактозоположительные кишечные палочки, ферментирующие лактозу до кислоты и газа при температуре 43-44,5°C в присутствии ингибиторов посторонней микрофлоры и образующие индол при той же температуре. В основном это бактерии рода *Escherichia*, но могут быть отнесены в эту группу и представители других родов, обладающие такими же свойствами (например, *Citrobacter* и др.). *E. coli* определяют теми же методами: мембранных фильтров, прямого посева и титрационным.

Различие - на этапе исследования свойств микроорганизмов, выросших на среде Эндо. Результат исследования выражают количеством *E. coli* в 1 л (Coli-индекс).

Метод прямого посева применяется при определении *E. coli* в сточных водах и сильно загрязненной воде водоемов. На чашки со средой Эндо засевают по 0,1-0,5 мл пробы воды (по 4 дозы из каждой пробы), тщательно втирают шпателем и инкубируют в течение 16-18 ч при температуре 37°C. Учитывают рост характерных колоний, определяют биохимические свойства бактерий и определяют коли-индекс, ориентируясь на таблицы.

Определение энтерококков

Энтерококки в последние годы привлекают к себе внимание как микроорганизмы – показатели фекального загрязнения. Они обнаруживаются в окружающей среде, куда попадают с испражнениями человека, животных, птиц, насекомых, являясь постоянными обитателями кишечника. В почве и воде они сохраняются до 6 недель, но не размножаются и не изменяют свои основные биологические свойства. Выживаемость энтерококков в воде приближается к выживаемости патогенных энтеробактерий. Они устойчивы к повышению температуры (нагревание до 55-60°C выдерживают в течение 1 ч), хорошо переносят низкую температуру, обладают значительной устойчивостью к хлору. Все это дает право считать энтерококки вторым после кишечной палочки санитарно-показательным микроорганизмом при исследовании воды.

Особое значение имеет определение энтерококков в воде плавательных бассейнов как более устойчивых к действию обеззараживающих веществ, чем БГКП.

Определение энтерококков проводят методом мембранных фильтров, титрационным, а при большой загрязненности воды (свыше 30 бактерий в 1 мл) – методом прямого посева.

Сущность метода мембранных фильтров состоит в концентрации энтерококков из определенного объема воды на мембранных фильтрах с последующим подращиванием микробов на специальных средах, идентификации и определении индекса энтерококков.

Объем воды (2-3 десятикратных разведения) выбирают с таким расчетом, чтобы на фильтрах выросло не менее 10 и не более 50 изолированных колоний (ориентируясь по таблице 4.5). Фильтры, через которые пропускают выбранные объемы воды, помещают в чашки Петри на среду Сланеца или желчную среду и инкубируют при температуре 37°C в течение 24 ч. На среде Сланеца вырастают характерные колонии: некрупные, выпуклые, круглые, темно-вишневые или розовые с темно- вишневым центром (окраска колоний зависит от степени восстановления ТТХ). На желчной среде колонии плоские, крупные с ровными краями, белые с кремовым или розовым оттенком, а также малиновые. Малиновый цвет характерен для колоний *S. faecalis*. Принадлежность колоний к энтерококкам подтверждается микроскопией мазков, окрашенных по Граму, и отсутствием каталазной активности (Приложение Б).

Подсчитывают количество выросших колоний и вычисляют число энтерококков в исследуемой воде исходя из объемов воды, профильтрованных через мембранные фильтры. Общее количество колоний делят на объем воды и умножают на 1000.

Сущность титрационного метода определения энтерококков заключается в посеве различных объемов исследуемой воды в жидкую селективную среду для накопления микроорганизмов с последующим высевом на плотную молочно-ингибиторную среду для получения отдельных колоний, их идентификации и подсчета индекса энтерококков. Титрационный метод дает более точные количественные данные о содержании энтерококков в воде. Объемы воды выбирают с таким расчетом, чтобы при наиболее высоком разведении наблюдался один или несколько отрицательных результатов (при этом следует ориентироваться на таблицу 4.5). Каждый объем или разбавление исследуемой воды засевают в 2 или 3 повторностях. Объемы воды 100 мл и 10 мл засевают в 100 и 10 мл (соответственно) щелочно-полимиксиновой среды двойной концентрации, 1 мл и по 1 мл десятикратных разведения засевают в 5 мл этой же среды обычной концентрации. Выдерживают в термостате в течение 24 ч при температуре 37°C, затем из всех колб и пробирок, в которых наблюдается рост бактерий (помутнение, изменение цвета среды с синего на зеленый или желтый), делают высевы на сектора в чашки Петри с молочно-ингибиторной средой. Пробирки с посевами в щелочно-полимиксиновую среду, в которых еще нет признаков роста, оставляют на сутки в термостате, и если в каких-нибудь пробирках появился рост, то также делают высев на молочно- ингибиторную среду. После 24 ч инкубирования в термостате учитывают колонии аспидно-

черные, выпуклые, с металлическим блеском (*S. faecalis*), а также колонии, окруженные узкой зоной просветления с выпадением по периферии осадка параказеина (*S. faecium*, *биовар liquefaciens*), мелкие серые колонии (*S. faecium*, *биовар durans*). Из части колоний (выборочно) следует приготовить мазки, окрасить по Граму. Наличие энтерококков дает возможность дать заключительный ответ. Индекс энтерококков определяют по таблице 4.4.

При определении энтерококков методом прямого посева (в основном при исследовании сточных вод) делают посевы исследуемой воды непосредственно на чашки Петри со средой Сланеца или желчной средой в 2 или 5 повторностях. Обычно берут 1 мл, 0,5, 0,2 и 0,1 мл из каждого десятикратного разведения. Засеваемую воду тщательно втирают шпателем в поверхность питательной среды до полного впитывания воды. Идентификация и подсчет энтерококков проводятся так же, как при определении титрационным методом.

Определение споровых сульфитредуцирующих клостридий

Сульфитредуцирующие клостридии (представитель этой группы микроорганизмов – *Clostridium perfringens*) – спорообразующие анаэробные палочковидные микроорганизмы, редуцирующие сульфит натрия на железосульфитном агаре при температуре 44°C в течение 16-18 ч. Метод основан на выращивании посевов в железосульфитном агаре в условиях, приближенных к анаэробным, и подсчете числа черных колоний.

Количественно эти микроорганизмы в воде можно определить методом мембранной фильтрации или прямым посевом. В качестве питательной среды для выделения и подсчета сульфитредуцирующих клостридий обычно используют среду Вильсона-Блера (железосульфитный агар).

Перед посевом пробу воды прогревают на водяной бане при температуре (75±5)°C в течение 15 мин. для исключения вегетативных форм. При исследовании хлорированной воды, ее можно не прогревать. Применяя метод мембранной фильтрации, пробу воды определенного объема пропускают через фильтр, который затем помещается в пробирку с подготовленной расплавленной питательной средой верхней стороной внутрь (пробирка с питательной средой после посева должна быть немедленно охлаждена в холодной воде во избежание попадания воздуха) или в чашку Петри на поверхность питательной среды, которая затем заливается той же питательной средой толстым слоем.

Метод прямого посева предполагает посев в стерильные пробирки 20 мл воды следующим образом: по 10 мл в 2 пробирки (объемом не менее 30 мл), или по 5 мл в 4 пробирки (объемом не менее 15 мл).

Сверху посевы воды заливают горячим (75-80°C) железосульфитным агаром в количестве, превышающем объем воды в 2 раза. Среду заливают по стенке пробирки, стараясь не допустить образования пузырьков воздуха. Пробирки с посевами быстро охлаждают в стакане с холодной водой, инкубируют при 44°C в течение 24 ч.

Количественному учету подлежат только те посевы, где получены изолированные колонии. Подсчитывают черные колонии, выросшие как на

фильтре, так и в толще питательной среды. Результат анализа выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) спор сульфит-редуцирующих клостридий в определенном объеме воды (подвергнутой анализу).

Определение бактериофагов

Присутствие бактериофагов в воде, говорит о фекальном загрязнении, и является индикатором или сигналом о возможном присутствии энтеровирусов. Поэтому методы определения бактериофагов (в т.ч. и колифагов) включены в методические указания Минздрава Украины и регламентированы Международными стандартами (ИСО 10705-1:1995; 10705-2:2000; 10705-3; 10705-4).

Существует несколько методов количественного и качественного определения бактериофагов в воде.

Все методы основаны на чувствительности музейных культур микроорганизмов и предполагают использование следующих тест-организмов (по международным стандартам): мутант *Salmonella typhimurium*, непатогенный для человека; штамм *Escherichia coli* K-12 Hfr из соответствующей коллекции культур ATCC 23631 или NTCT12486; штамм *E.coli* рода CN, называемый WG5; а также бактериофаги MS2, NCTC12487 или ATCC 15597 для контроля чувствительности тест-организмов.

Международным стандартом регламентируются методы определения бактериофагов РНК типа F и соматических бактериофагов, которые позволяют определить присутствие/отсутствие бактериофагов, а также дать их количественную оценку (ИСО 10705-1).

Бактериофаги РНК типа F – это бактериальные вирусы, способные инфицировать определенный штамм хозяина с помощью F-фимбрий или половых фимбрий. Соматические бактериофаги являются непатогенными для человека, однако являются устойчивыми к внешним факторам, особенно к высушиванию.

Прямой метод выявления бактериофагов

Данный метод применяется при определении исследований по эпидпоказаниям или в случае необходимости получения результатов в короткие сроки.

Ход определения. За 18-24 часа перед проведением анализа необходимо сделать посев тест-культуры *E. coli* K12 F+ (Рос.гос.ин-т мед.и биол. препаратов им. Л.А. Тарасевича) на косяк с питательным агаром (МПА). Перед проведением анализа сделать смыв с косяка 5 мл стерильной водопроводной воды и по стандарту мутности приготовить взвесь тест-организма в концентрации 10⁹ бакт. клеток/мл.

Расплавить и остудить до 45°C 2%-ный питательный агар. Исследуемую воду 100 мл внести в 5 стерильных чашек Петри (по 20 мл в каждую). В питательную среду добавить смыв *E. coli* (из расчета 1,5 мл на 150 мл агара) и хорошо перемешать. Полученной смесью залить по 30 мл сначала пустую чашку Петри (контроль), а затем все чашки, содержащие исследуемую воду. Содержимое чашек перемешивают вращательными движениями. После застывания питательной среды чашки переворачивают вверх дном и ставят для инкубирования в термостат при 37°C на 18-24 ч.

Учет результатов проводят путем подсчета и суммирования бляшек, выросших на 5-ти чашках Петри. Результаты выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ) на 100 мл воды.

В контрольной пробе бляшки должны отсутствовать.

Санитарно-микробиологическая оценка воды

Оценка качества воды производится комплексно: по санитарно-микробиологическим показателям с учетом органолептических, гельминтологических и химических данных и регламентируется соответствующими ГОСТами, Санитарными правилами и методическими указаниями. Безусловным показателем загрязненности воды является обнаружение патогенных микроорганизмов. В этом случае вода считается непригодной для любых целей.

Критерии оценки качества воды разработаны дифференциально в зависимости от категории воды и ее назначения представлены в Приложении В.

При оценке питьевой воды руководствуются основным требованием: она не должна содержать патогенные бактерии и вирусы. При санитарно-бактериологической оценке воды колодцев исходят из того, чтобы в 1 л БГКП содержалось не более 10. Показателем фекального загрязнения воды колодцев является обнаружение энтерококков. Отсутствие обеззараживания колодезной воды, возможность биологической контаминации (осадки, просачивание загрязненных ливневых и грунтовых вод и т.д.) делают ее эпидемически опасной, и поэтому требуется постоянный контроль. При обнаружении в воде энтерококков вода считается непригодной к употреблению, и колодец подлежит очистке.

Если при выборе нового источника водопользования коли-индекс воды водоема превышает 10000 в 1 л, то проводится дополнительное исследование на присутствие *E. coli* и энтерококков как показателей свежего фекального загрязнения и непосредственное обнаружение патогенных бактерий - сальмонелл и шигелл.

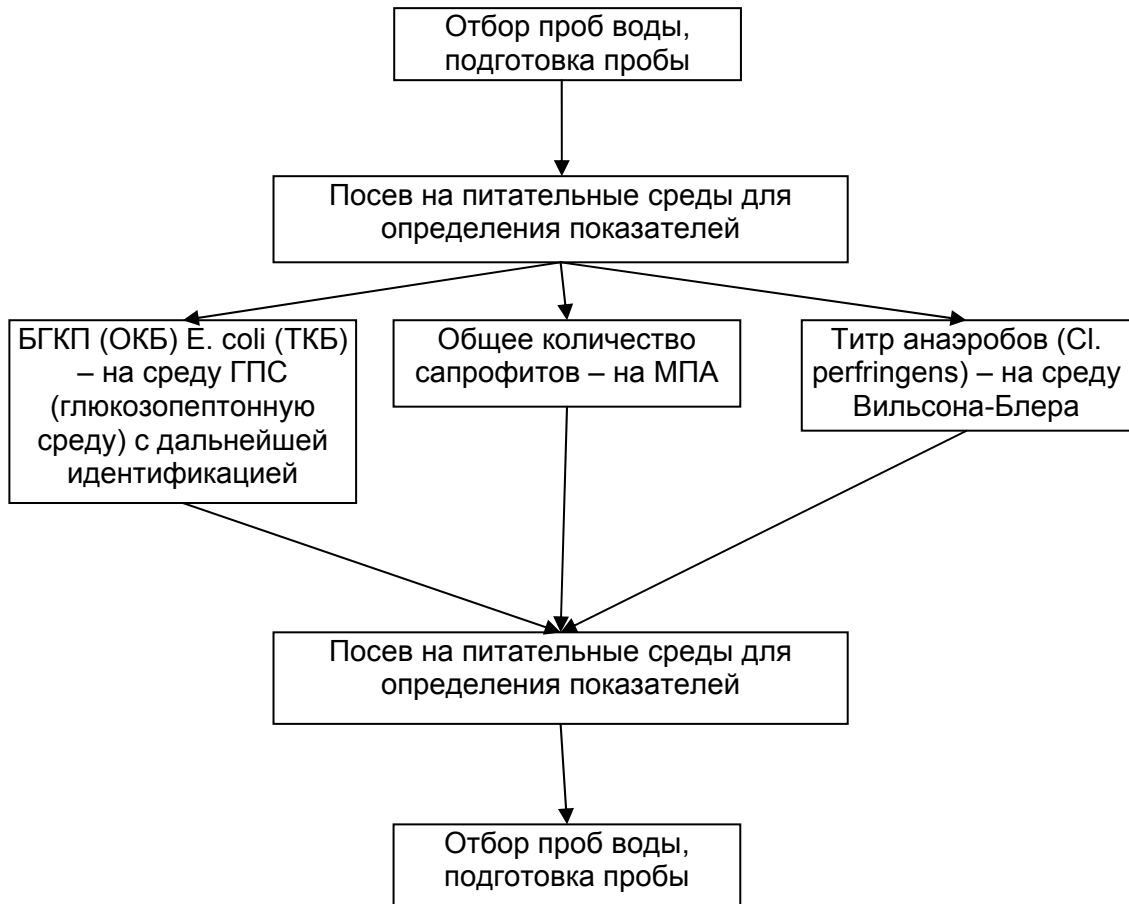
При индексе *E. coli*, энтерококков более 1000 в 1 л вода водоема расценивается как загрязненная, причем контаминация считается свежей, а вода - опасной в эпидемическом отношении. В последние годы разработаны и предложены [Григорьева Л. В., 1975] дополнительные критерии оценки санитарного состояния водоемов, в которые включены показатели титра энтерококков, перфрингенс-титр и индекс бактериофагов.

4.2. Экспериментальная часть

Порядок выполнения работы:

- 1) Провести посев проб воды методом бродильных проб для определения показателей.
- 2) Сделать пересев со среды ГПС (Кесслер) на дифференциально-диагностическую среду Эндо.
- 3) Провести биохимические тесты колоний, выросших на среде Эндо.
- 4) Определить количественные показатели санитарного состояния воды (индекс ОКБ, ТКБ, сульфит-редуцирующих клостридий, общую обсемененность).
- 5) Дать оценку санитарного состояния водного объекта, откуда была взята проба воды. Возможность использования воды на питьевые цели.

Алгоритм работы



Контрольные вопросы:

1. Какими факторами определяются количественный и качественный состав микрофлоры воды?
2. Какой объем воды отбирается для санитарно-микробиологических исследований? Рассмотреть все случаи.
3. Какие виды микроорганизмов определяются в воде питьевой в качестве санитарно-показательной микрофлоры?
4. Как регламентируется время между отбором проб и началом микробиологических исследований нормативно-техническими документами?
5. При какой температуре транспортируют отобранные пробы воды? Почему?
6. В каких случаях в воде определяются патогенные микроорганизмы (какие)? Какие методы для этого применяют?
7. На каких свойствах микроорганизмов основаны ускоренные методы определения патогенных микроорганизмов? В чем заключаются их недостатки?
8. Какими биохимическими признаками должен обладать выделенный микроорганизм, чтобы его можно было отнести к *E. coli*? Какими показателями отличаются *E. coli* от ЛКП?
9. В каких случаях для определения количества сапрофитных микроорганизмов может использоваться прямой метод? В чем он заключается?
10. Объясните цель раздельного определения количества мезофильных и термофильных сапрофитов в воде.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

ИНДИКАТОРНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Цель работы: *познакомиться с методами выявления, определения и учета простейших (Protozoa) в природных водоемах.*

5.1. Теоретические сведения

5.1.1. Распространение, значение и строение простейших

Оценка качества воды в водоеме производится на основании результатов физико-химического, бактериологического и биологического анализов. Каждый из перечисленных видов анализа имеет свои достоинства и недостатки, они не заменяют друг друга, и наиболее достоверная оценка получается при сочетании всех трех методов.

Физико-химические исследования позволяют оценить величину и характер загрязнения, его влияние на изменение качества воды. Бактериологический анализ дает возможность определить вероятность нахождения в воде патогенных микроорганизмов. Биологический анализ способствует установлению степени загрязнения водоема в целом. В некоторых случаях он помогает зафиксировать последствия кратковременного загрязнения водоема, которое не может быть зарегистрировано методами физико-химического и бактериологического исследования.

Биологический анализ воды основан на приуроченности некоторых организмов к воде определенной степени загрязнения.

Для биологической индикации качества природных водоемов необходимо познакомиться со строением и принципами систематики простейших.

На протяжении примерно 80% всего периода органической эволюции, происходящей на Земле, наша планета была населена исключительно микроорганизмами и простейшими. Они существовали, когда планета только приобретала свой нынешний вид, когда сдвигались и расходились континенты, а земная кора много раз опускалась и сжималась в складки. При активном участии микроорганизмов и почвенных простейших возникали залежи руд, угля, месторождения нефти и природного газа (Шлегель, 1987).

Подцарство простейших (Protozoa: греч. protos первый, zoon животное) насчитывает, примерно, 50000 видов. Простейшие, обитающие в океанах, пресных водах, почве и в высших организмах, занимают важнейшее место в круговороте веществ в биосфере. В водной среде простейшие – основа планктона, используемого в пищу другими более крупными животными. Из скелетов простейших: фораминифер, радиолярий и панцирных жгутиконосцев образуются мощные пласты осадочных пород.

Многие водные простейшие – седиментаторы, питающиеся взвешенными органическими частицами и бактериями, играют существенную роль в биологической очистке вод. В пресных водах обитают представители типов: саркодовых – Sarcodina, жгутиковых – Mastigophora и инфузорий – Ciliophora (рис. 5.1).

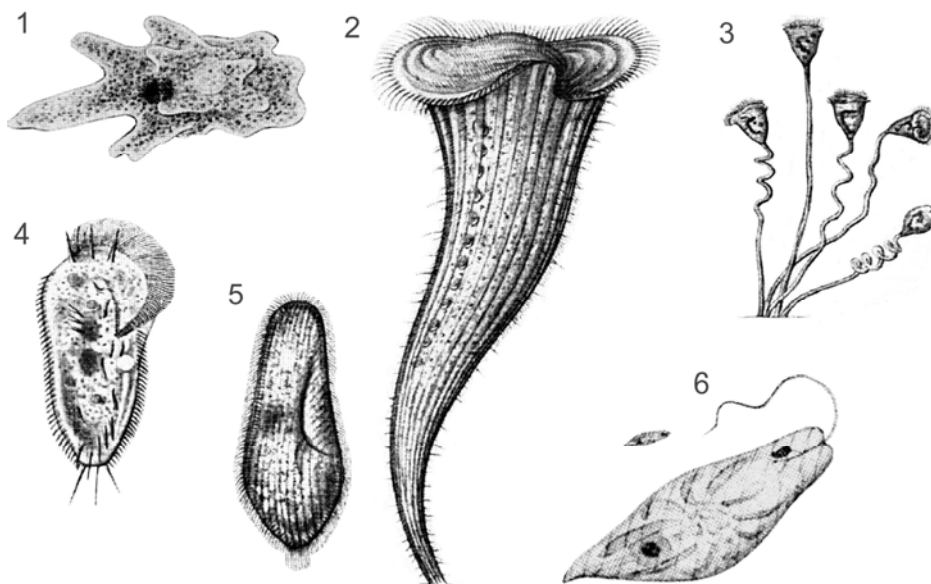


Рис. 5.1 – Представители простейших (Protozoa):

- 1 – амеба протейс (*Amoeba proteus*); 2 – голубой трубач (*Stentor coeruleus*);
 3 – вортицелла микростомата – сувойка (*Vorticella microstomata*);
 4 – стилонихия митилус (*Stylonychia mytilus*); 5 – инфузория-туфелька (*Paramecium caudatum*); 6 – эвглена зеленая (*Euglena viridis*)

Почвенные амёбы, инфузории и жгутиконосцы – важное звено почвенной фауны: они принимают участие в почвообразовании. Ряд видов простейших составляют полезную группу симбионтов высших животных, улучшающих пищеварение и обменные процессы в организме. Например, малоресничные инфузории в рубце у жвачных, а жгутиковые в кишечнике термитов помогают хозяину переваривать клетчатку.

Паразитические простейшие в природе представляют важный фактор естественного отбора, регулирующий численность других видов животных и растений. Однако человеку простейшие могут приносить не только пользу, но и большой вред. В организме человека паразитирует около 30 видов простейших. Некоторые из них вызывают опасные протозойные заболевания: амёбиаз, трипаносомозы, лейшманиозы, лямблиоз, трихомониаз, малярию, токсоплазмоз и др.

К простейшим относятся организмы, тело которых состоит из цитоплазмы и одного или нескольких ядер. Цитоплазма в теле простейших образует одну клетку, поэтому их называют одноклеточными.

Клетка простейшего – самостоятельная особь, выполняющая все функции целостного организма, поэтому простейшие являются удобными объектами для разнообразных биохимических исследований: на них можно изучать как клеточные, так и организменные реакции на токсическое воздействие.

подавляющее большинство простейших имеет микроскопические размеры, колеблющиеся в пределах от 3 до 150 мкм.

Части тела простейшего, выполняющие различные функции, называют органеллами, или органоидами. Имеются органоиды двух типов: общего значения, характерные для любых клеток (митохондрии, центросомы, рибосомы и др.), и специального значения, выполняющие жизненные функции одноклеточных как самостоятельных организмов (рис. 5.2).

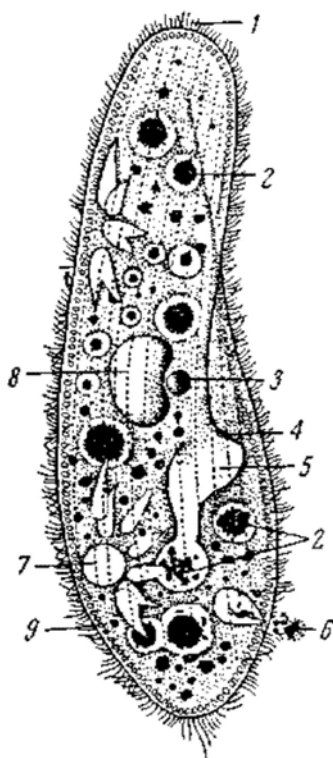


Рис. 5.2 – Строение инфузории-туфельки: 1 – реснички; 2 – пищеварительные вакуоли; 3 – микронуклеус; 4 – клеточный рот; 5 – клеточная глотка; 6 – порошица в момент выбрасывания непереваренных остатков пищи; 7 – сократительная вакуоль (центральный резервуар и радиально расположенные приводящие каналы); 8 – макронуклеус; 9 – трихоцисты

Органоидами движения у различных представителей типа могут быть ложноножки (псевдоподии), жгутики, реснички (см. рис. 5.1). Реснички могут сливаться друг с другом, образуя мембраны и плотные негнущиеся щетинки – цирры (см. 4 рис. 5.1). Ползание или ходьба распространено среди инфузорий, имеющих цирры, на которых животное передвигается, как на ходулях. Количество и расположение цирр служат диагностическим признаком.

Некоторым высокоорганизованным простейшим (инфузориям) свойственна еще одна форма движения – сокращение. Тело таких простейших способно быстро менять свою форму, а затем вновь возвращаться к исходному состоянию. Способность к быстрому сокращению обусловлена наличием в теле простейших особых волоконцев – мионем – образований, аналогичных мышцам многоклеточных животных. Сократительное движение свойственно в основном инфузориям, ведущим прикрепленный образ жизни: сокращается тело, или стебелек, на котором располагается животное 3.

Наружная поверхность цитоплазмы простейших – плотная эластичная мембрана (оболочка) называемая *пелликулой*. Те простейшие, у которых эта оболочка неразличима, называются голыми (см. амебы, рис. 5.1). Пелликула состоит в основном из жироподобных веществ и обладает свойством полупроницаемой мембраны. Пелликула может быть гладкой, но может иметь и сложное строение. Многие простейшие имеют наружный скелет в виде раковины.

Органоиды пищеварения у большинства простейших состоят, прежде всего, из пищеварительных вакуолей. У высокоорганизованных представителей простейших (инфузории) органоиды пищеварения начинаются клеточным ртом

4, продолжают в клеточную глотку 5, от которой берут свое начало пищеварительные вакуоли 2 и заканчиваются порошицей 6 – отверстие в пелликуле, через которое выбрасываются непереваренные остатки пищи.

Питание происходит различными путями. Некоторые заглатывают пищу путем фагоцитоза (голозойный тип питания). Иногда органические вещества всасываются осмотически. У некоторых из простейших имеется хлорофилл, и в известной мере они способны к автотрофному типу питания путем фотосинтеза.

Простейшие питаются главным образом бактериями и мелкими взвешенными веществами. Благодаря этому они играют важную роль в процессах осветления воды.

Как правило, в теле простейших имеются сократительные (пульсирующие) вакуоли 7, играющие роль органоидов осморегуляции, выделения и дыхания. Особенно хорошо развиты сократительные вакуоли у пресноводных простейших.

Ядерный аппарат простейших очень разнообразен. Все животные обладают хорошо выраженным ядром (или ядрами), отделенным от цитоплазмы ядерной мембраной. Форма ядра бывает округлой, овальной, подковообразной и т.д. У инфузорий имеются два ядра. Более крупное, называемое *макронуклеусом* 8, принимает участие в выполнении функций питания, обмена, роста и различных физиологических реакций. Меньшее ядро – *микронуклеус* – участвует в процессе полового размножения. У простейших, обладающих одним ядром, оно несет обе функции.

Бесполое размножение простейших осуществляется путем деления клетки, причем жгутиковым свойственно продольное деление, а ресничным инфузориям – поперечное. Организмы, не имеющие осевой симметрии, например, амёбы, делятся в любом направлении.

Половое размножение простейших осуществляется разными путями: у одних форм сливаются клетки, у других – ядра внутри одной и той же клетки, у третьих происходит обмен ядерным веществом.

Органоиды нападения и защиты представлены трихоцистами 9. Они расположены в протоплазме перпендикулярно к поверхности тела под самой пелликулой. Трихоцисты выстреливаются и затем заменяются новыми.

Многие простейшие в неблагоприятных условиях образуют *цисты*, т.е. становятся неподвижными, принимают округлую форму, перестают питаться (процессы обмена веществ замедляются), снаружи покрываются плотной оболочкой, защищающей их от высыхания, неблагоприятной температуры, воздействия вредных веществ. В инцистированном состоянии простейшие легко расселяются. При попадании цист в благоприятные условия происходят эксцистирование и превращение в вегетативную форму, способную к передвижению, питанию и т. д.

Простейшие, несмотря на свои микроскопические размеры, выполняют глобальную роль в функционировании современной биосферы. Мир простейших участвует в различных геохимических процессах и биологическом круговороте основных жизненно важных элементов – углерода, азота, фосфора и серы. Простейшие принимают участие в «самоочищении» природных вод и почв, их используют для биологической очистки сточных вод. Они являются индикаторами загрязнения воды и почв. Наибольшее значение в биоиндикации и биотестировании играют инфузории.

5.1.2. Классификация инфузорий

Классификация инфузорий базируется на структуре ресничного аппарата всего тела, в том числе и околоротового. Тип инфузории делится на два класса: класс ресничных инфузорий (Ciliata) и класс сосущих инфузорий (Suctoria).

Представители ресничных инфузорий обладают ресничками на протяжении всех фаз развития, а сосущие инфузории лишены ресничек на большей части жизненного цикла.

Класс ресничных – центральный, наиболее многочисленный класс инфузорий, который включает 3 подкласса и около 20 отрядов.

1. Подкласс Равноресничные инфузории (HOLOTRICHA) – тело равноресничных равномерно покрыто ресничками одинаковой длины. Около рта, как правило, мембранелл нет.

1. Отряд Простоматиды (Prostomatida) – тело инфузорий покрыто толстым панцирем, состоящим из многих рядов пластинок.

Колепс гиртус (Coleps hirtus) – мелкие клетки, бочонковидной формы, бурого цвета. Тело покрыто многочисленными небольшими пластинками, создающими эффект панциря. Длина тела 20–25 мкм, ширина 10–15 мкм. На переднем полюсе клетки едва заметные зубчики, прикрывающие клеточный рот. На задней части тела хорошо видна одна каудальная ресничка, которая в несколько раз длиннее остальных. Сократительная вакуоль одна, находится на заднем конце тела. Макронуклеус округлый, одиночный, расположен центрально. Обитатель альфа-мезосапробных и полисапробных водоемов (прил. А, фото 1).

2. Отряд Гимностоматиды (Gymnostomatida) характеризуется расположением рта на переднем конце клетки или сбоку. Это в основном хищные инфузории. У многих из них хорошо развит палочковый аппарат в цитоплазме около рта, который способствует прободению клетки жертвы.

Представитель этого отряда – инфузория **Дилептус ансер (Dileptus anser)** с щупальцевым отростком на переднем конце и с боковым положением рта. *Dileptus anser* – крупные инфузории: длина тела 70–90 мкм, ширина 14–20 мкм. Передний конец тела вытянут в виде хоботка, длина которого чуть меньше половины общей длины тела. Каудальная часть клетки не образует шиповатого выроста. Макронуклеус одиночный, четковидный, располагается в середине тела. Сократительная вакуоль одна, находится в задней части клетки. Инфузории загоняют пищу в рот с помощью длинного переднего отростка. Обитают в водоемах средней загрязненности (прил. А, фото 2).

Спатидиум поркулюс (Spathidium porculus) – крупные инфузории, длина тела 100–120 мкм. Форма клеток кувшиноподобная. Клеточный рот расположен в передней части, широкий, по бокам крупные реснички. Макронуклеус колбасовидный, расположен в центре тела. Сократительная вакуоль находится в каудальной части тела. Инфузории передвигаются медленно. Обитают обычно в загрязненных водоемах (прил. А, фото 3).

3. Отряд Кольподиды (Colpodida) – клетки от мелких размеров до крупных. Клеточный рот располагается по середине брюшной стороны, окаймлен длинными ресничками. Передняя часть тела образует киль.

Кольпода кукуллюс (Colpoda cucullus) – имеют хорошо выраженную бобовидную форму тела: выпуклая спинная сторона, а на брюшной стороне

имеется глубокое полукруглое углубление, на дне которого находится клеточный рот. Окраска инфузорий темная: от коричневой до черной. Цитоплазма забита пищеварительными вакуолями. Реснички равномерно покрывают тело, образуя 18–20 рядов. Макронуклеус округлый, расположен в срединной части тела. Сократительная вакуоль находится на заднем конце тела. Встречается в водоемах альфа-мезосапробных и полисапробных (прил. А, фото 4).

Кольпода мапази (*Colpoda maupasi*) – клетки широкоовальные, темного цвета. Длина 35–70 мкм, ширина 20–40 мкм. На переднем конце тела имеется киль с хорошо заметными 6–7 зубчиками. Длина киля составляет 1/3 от длины тела. Задний конец тела клетки широко закруглен. Макронуклеус округлый, смещен к спинной стороне. Сократительная вакуоль расположена на заднем конце тела. Инфузории обитают в мезосапробных водоемах (прил. А, фото 5).

Кольпода штейни (*Colpoda steini*) – мелкие инфузории, длина колеблется в пределах 20–35 мкм, ширина 15–30 мкм. Форма тела односторонне выпуклая, причем выпуклой является спинная сторона, а брюшная – почти плоская. В срединной части брюшной стороны в небольшом углублении располагается клеточный рот, окруженный длинными ресничками, образующими «бороду». На переднем киле 6–7 ясно выраженных ребер. Макронуклеус овальный, располагается ближе к спинной стороне. Сократительная вакуоль одна, находится на заднем конце тела. Обитает в альфа-мезосапробных водоемах (прил. А, фото 6).

Кольпода аспера (*Colpoda aspera*) – клетки овальной формы, немного сжатые с боков, цитоплазма светлая. Длина клеток 30–50 мкм, ширина 15–25 мкм. Ресничных рядов 14–16. Передний киль с 5 зубчиками. Клеточный рот расположен ближе к середине тела, окружен более длинными ресничками. Макронуклеус округлой формы, располагается ближе к спинной стороне. Сократительная вакуоль – в задней части клетки. Обитатель мезосапробных водоемов (прил. А, фото 7).

4. Отряд Гименостоматиды (*Hymenostomatida*) – наиболее многочисленный по числу видов. Большинство видов отряда свободноживущие, например, инфузория-туфелька (*Paramecium caudatum*). Для этого отряда характерно наличие ротовой воронки – перистомы, которая окружена с одной стороны длинной мембраной, напротив которой на другой стороне расположены три мембранеллы. Инфузории питаются, как правило, бактериями.

Инфузория-туфелька (*Paramecium caudatum*) – крупные инфузории, длина тела колеблется в пределах 180–280 мкм. Форма тела овальная, вытянуто в длину, напоминает туфельку. Наибольшая ширина в задней трети. Задний конец несколько заострен и несет более длинные реснички, чем остальное тело. На одной стороне тела (брюшной) внутрь вдается глубокий желоб, ведущий в глотку. Все тело инфузории покрыто ресничками, их число примерно 15 тысяч. Ядерный аппарат состоит из почковидного макронуклеуса и одного, довольно крупного микронуклеуса. Инфузории-туфельки обитают в мезосапробных водоемах (прил. А, фото 8).

Кольпидиум кольпода (*Colpidium colpoda*) – мелкие инфузории, длина тела колеблется в пределах 70–90 мкм, ширина – 35–50 мкм. Форма тела напоминает боб: вентральная сторона вогнутая, дорсальная – выпуклая. Ротовое отверстие треугольной формы, окаймлено рядами ресничек.

Ресничный покров густой и равномерный, ресничных рядов много. Макронуклеус округлый, расположен в середине тела. Сократительная вакуоль находится на заднем конце тела. Инфузории обитают в мезосапробных водоемах (прил. А, фото 9).

Уронема маринум (*Uronema marinum*) – мелкие инфузории, длина тела колеблется в пределах 18–30 мкм., ширина – 7–12 мкм. Форма тела удлинненно-овальная, задняя часть немного расширена. Ресничный покров мало заметен. На заднем конце тела имеется длинная каудальная щетинка. Ротовое отверстие находится в передней части тела. Макронуклеус округлый, находится в середине тела. Сократительная вакуоль размещается в нижней части тела. Обитатель средне загрязненных водоемов (прил. А, фото 10).

II. Подкласс Кругоресничные инфузории (PERITRICHIA) – реснички у кругоресничных располагаются только вокруг ротовой воронки, образуя левозакрученную спираль. Большинство видов ведут прикрепленный образ жизни.

Типичный представитель – **Вортицелла микростомата (*Vorticella microstomata*)**, мелкие инфузории, длина тела колеблется в пределах 30–35 мкм, ширина 25–28 мкм. Форма тела бокаловидная, равномерно сужающаяся кверху. От основания клетки отходит сократимый стебелек, в котором проходит пучок мионем. С помощью стебелька инфузория прикрепляется к субстрату. При резком скручивании стебелька сувойка мгновенно спасается от опасности. Некоторые перитрихиды живут в домиках, другие образуют колонии (*Zoothamnium*), имеющие вид пальмы. Размножаются сувойки почкованием. При этом образуется свободноплавающая форма – «бродяжка». В дальнейшем при оседании на дно у нее образуется стебелек. Стебелек превышает размеры клеток в 3–4 раза. Рот окружен венчиком длинных ресничек, от него отходит конусовидная глотка. Макронуклеус большой, с-образноизогнутый, лежит поперек тела. Обитатель полисапробной зоны (прил. А, фото 11).

III. Подкласс Спиральноресничные (SPIRITRICHIA) – у представителей этого подкласса отсутствуют ресничный аппарат. Ротовые реснички сильно развиты.

1. Отряд Олиготрихиды (*Oligotrichidae*) – реснички в основном исчезли у них полностью, сохранились лишь короткие ряды отдельных щетинок или весьма мало ресничек.

Стромбидиум вириди (*Strombidium viride*) – мелкие инфузории, длина тела колеблется в пределах 34–50 мкм, ширина – 27–41 мкм. Форма тела ближе к шаровидной: передняя часть широкозакруглена, задняя – немного вытянута. Ресничный покров отсутствует. Рот находится на апикальном полюсе, окружен венчиком мощных мембранелл. Макронуклеус овальной формы, лежит на экваторе клетки. Сократительная вакуоль расположена на апикальной части клетки. Обитатель мезосапробной зоны (прил. А, фото 12).

2. Отряд Гипотрихиды (*Hypotrichida*)

Уролентус пусцис (*Uroleptus piscis*) – крупные инфузории, длина тела колеблется в пределах 58–85 мкм, ширина – 14–27 мкм. Тело удлиненной, овальной формы: задний край плавно закруглен, передний – немного заужен. На вентральной стороне имеется 2 ряда цирр. Клеточный рот достигает 1/3 длины тела. Макронуклеусов два, они почти вплотную прилегают друг к другу, находятся в середине клетки. Сократительных вакуолей тоже две: одна в

каудальной части, другая недалеко от клеточного рта. Обитает в водоемах с сильным органическим загрязнением (прил. А, фото 13).

Окситриха пеллионелла (*Oxytricha pellionella*) – крупные инфузории, длина тела колеблется в пределах 50–50 мкм, ширина – 15–20 мкм. Форма тела длинноовальная, равномерно закругленная на обоих концах. В области клеточного рта имеется 8 фронтальных цирр. На заднем конце тела – 5 очень длинных цирр, выходящих за пределы клетки. Тело очень гибкое. Клеточный рот занимает 1/4 часть длины тела. Макронуклеус двучленистый, расположен по оси тела. Сократительная вакуоль расположена ближе к перистому. Хороший показатель высокой степени органического загрязнения (прил. А, фото 14).

Стилонихия митилус (*Stylonichia mytilus*) – крупные инфузории, длина тела колеблется в пределах 70–90 мкм, ширина – 28–35 мкм. Форма тела удлинненно-овальная, передняя часть несколько расширена, задняя сужена. Перистом очень большой, почти треугольной формы, составляет 1/3 длины тела. Тело негибкое. Макронуклеусов два, бобовидной формы, находятся в центральной части клетки. Сократительная вакуоль находится чуть ниже перистоста. Обитатель альфа-мезосапробной зоны (прил. А, фото 15).

Аспидиска костата (*Aspidisca costata*) – мелкие инфузории, длина тела колеблется в пределах 25–35 мкм, ширина – 20–30 мкм. Инфузории плоские, имеют широкояйцевидную форму тела. В области перистоста расположены 6 коротких цирр. Перистом небольшой. Макронуклеус длинный, подковообразный. Сократительная вакуоль расположена в задней части клетки. Показатель средней и высшей степени органического загрязнения (прил. А, фото 16).

5.2. Экспериментальная часть

5.2.1. Методика приготовления временного препарата

1. Возьмите предметное стекло, держа его за боковые грани, и положите на стол.
2. Глазной пипеткой возьмите небольшое количество анализируемой воды из природного водоема. Поместите каплю воды в центр предметного стекла.
3. Для замедления движения простейших необходимо в каплю воды добавить каплю раствора желатина.
4. Для выявления структур клетки необходимо в каплю воды добавить каплю раствора эозина.
5. После этого возьмите покровное стекло (обязательно за боковые грани, иначе оставите отпечатки пальцев на поверхности стекла) и опустите одну из боковых граней покровного стекла к краю анализируемой капли, так чтобы капля растеклась вдоль бокового края.
6. Затем медленно опустить покровное стекло на каплю воды.
7. Поместите препарат на предметный столик микроскопа и начните работу.

5.2.2. Правила оформления лабораторной работы

Необходимым элементом микроскопического изучения объекта является его зарисовка. Цель зарисовки – лучше понять и закрепить в памяти строение объекта, форму отдельных структур, их взаимное расположение.

Рисование на занятиях по микробиологии не самоцель, а метод изучения объекта, при зарисовке следует придерживаться ряда правил.

1. Рисовать можно только на одной стороне листа, так как рисунки, сделанные на обеих сторонах, накладываются друг на друга и со временем портятся.

2. Рисунок должен быть крупным, детали рисунка хорошо различимы. На одной странице не должно быть более 3–4 рисунков.

3. Главное требование к рисунку – правильное отображение формы, соотношения объема и размеров (длина, ширина и др.) отдельных частей и целого. Чтобы легче добиться этого, сначала нарисуйте общий контур объекта (крупно), затем внутри контура слегка наметьте контуры остальных деталей и после этого вырисовывайте их четко.

4. Правильное отражение соотношения размеров изучаемого объекта позволит выполнить и второе требование – показать индивидуальные особенности объекта, т.е. зарисовать не абстрактную, а конкретную клетку.

5. Вокруг рисунка не нужно рисовать контуров поля зрения микроскопа.

6. К каждому рисунку обязательно должны быть сделаны обозначения его отдельных частей. Обозначения можно делать двумя способами:

а) к отдельным частям объекта ставят стрелочки и против каждой пишут название. Все надписи должны быть расположены параллельно друг другу;

б) к отдельным частям объекта ставят стрелочки и против каждой пишут определенную цифру, затем сбоку от рисунка или под ним столбиком по вертикали пишут цифры, а против цифр – название.

7. Если работа выполнена правильно, в конце занятия ее подписывает преподаватель. Если работа не соответствует предъявляемым требованиям, ее необходимо переделать.

Материалы и оборудование: микроскоп, бюксы с природной водой, предметные и покровные стекла, пипетки, 0,1% раствор желатина, вата, фото или рисунки организмов-индикаторов, 0,01% раствор эозина.

Задание

Определить по описанию и зарисовать представителей инфузорий в жидкости, полученной от преподавателя.

Форма отчетности

Представить тетрадь с рисунками и выводами.

Контрольные вопросы:

1. Опишите строение простейших.
2. Опишите как питаются и размножаются простейшие.
3. Приведите классификацию инфузорий.
4. Опишите методику приготовления временного препарата.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6

БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АКТИВНОГО ИЛА И БИОПЛЕНКИ

Цель работы: научиться анализировать состояние активного ила и биопленки.

6.1. Теоретические сведения

Активный ил и биопленка представляют собой сформированный биоценоз. В его состав входят бактерии, простейшие, черви и некоторые членистоногие. Главная роль в переработке органических соединений принадлежит бактериям. Простейшие съедают бактерии и тонкодисперсную взвесь, чем способствуют осветлению жидкости. Другие представители биоценоза также принимают участие в осветлении жидкости. Постоянные наблюдения за ходом биологической очистки сточных вод показали, что состав активного ила и биопленки свидетельствует о качестве работы очистных сооружений.

Рассмотрим характеристику активного ила в различных условиях.

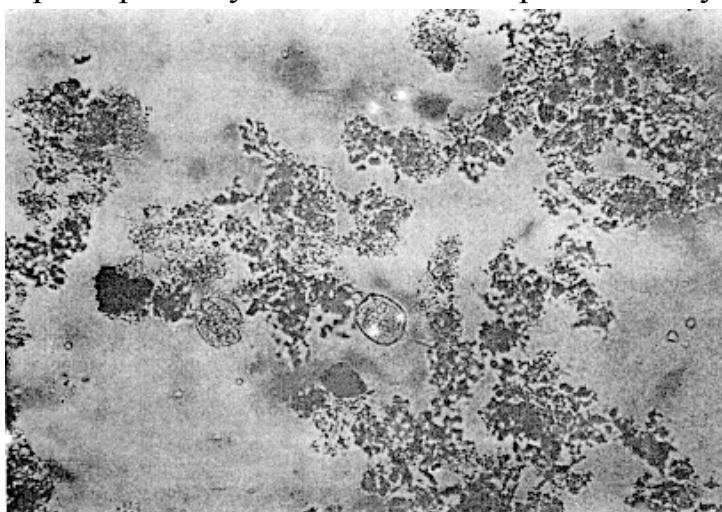


Рис. 6.1 – Удовлетворительно работающий активный ил.
Заметны *Euplates*

Удовлетворительно работающий ил (рис. 6.1)

В удовлетворительно работающем иле находятся различные простейшие с некоторым преимуществом одного из видов. Иногда встречаются *Lionotus*, *Podophrya*, *Vorticella microstoma*, жгутиковые и мелкие амёбы. Постоянно присутствуют чреворесничатые и кругоресничатые инфузории. Бактерии – преимущественно в зооглейных скоплениях. Все организмы подвижные, в оживленном состоянии. Хлопок ила компактный. Ил быстро оседает. Вода над илом прозрачная.

Голодающий ил

В случае низкой концентрации органических веществ в сточной жидкости активный ил чувствует "голодание". При этом простейшие постепенно мельчают, они становятся прозрачными, их пищевые вакуоли исчезают, инфузории превращаются в цисты. Коловратки образуют цисты позже, чем инфузории. Сера в клетках нитчатых серобактерий исчезает. Зооглеи и хлопья ила становятся прозрачными. Вода над илом мутная.

Нитрифицирующий ил

В случае недостатка органического питания и избытка минерального азота, в очищаемой жидкости может образовываться значительное количество нитритов и нитратов. При этом в воде в заметном количестве коловратки

(*Callidina*, *Rotatoria* и другие); преобладают *Peritricha* (*V. convallaria*, *Carchesium*), *Arcella*, крупные амёбы, буйно развиваются *Zoogloea ramigera*. Возможно присутствие в большом количестве малощетинковых червей *Aelosoma*. Отсутствуют *Chilodon*, мелкие амёбы, бесцветные жгутиковые. Хлопок ила рыхлый, после оседания всплывает.

Перегруженный ил (рис. 6.2)

Хлопки ила содержат механические включения. Коловратки съежились. Вортиелла имеет замкнутый ресничный диск. В том случае, когда активный ил не справляется с загрязнением, поступающей для биоценоза ила характерно малое разнообразие видов при численном превосходстве двух-трех из них.

Обычно наблюдается большое количество бесцветных жгутиковых, мелких амёб, *Lionotus* или мелких инфузорий. Иногда в заметном количестве присутствуют *Podophrya*, *Chilodon*, *Nematodes*, *V. microstoma*, *Opercularia* и нитчатые бактерии. Ил загрязнен различными вкраплениями: органическими аморфными частицами, мусором. Хлопки ила темные, густые. Вода над илом с опалесценцией.

Ил при изменении состава сточной воды

Наблюдается увеличение количества жгутиковых; преобразование простейших на цисты; гибель коловраток в сжатом состоянии; уменьшается количество нитчатых, которые в дальнейшем могут снова появляться.

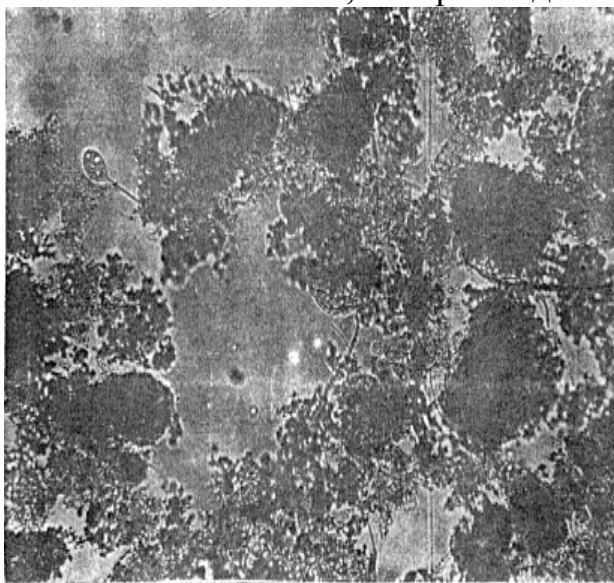


Рис. 6.2 – Активный ил при значительной перегрузке

Ил неадаптированный

Уменьшается число видов, имеют преимущество один-два вида. Гидробионты мельчают, особенно *Vorticella convallaria*, *Opercularia*, *Carchesium*. Общее количество растёт, или значительно уменьшается в зависимости от степени токсичности воды. Ресницы инфузорий неподвижные, ресничный диск оперкулярный замкнутый. Ил дробленный, загрязненный вкраплениями промстоков, имеет окрашенные частички, плохо оседает. Вода над илом мутная.

Ил при недостатке кислорода

В случае недостатка кислорода вортицеллы отрываются от стебелька и образуют особую свободноплавающую форму с венцом ресничек на заднем конце. При дальнейшем снижении концентрации кислорода появляются особи вортицелл, раздутые до круглой формы, которые затем лопаются. *Opercularia* с замкнутым ресничным диском, мелкие, неподвижные. Коловратки - окоченевшие в вытянутом состоянии или отмирающие их особи. В большом количестве появляются жгутиковые; из инфузорий преобладают *Paramaecium caudatum*, потому что они более устойчивы к недостатку кислорода и способны развиваться даже в гниющем иле, его хлопья при этом распадаются. Вода над илом мутнеет.

Вспухающий ил (рис. 6.3)

Массовое развитие нитчатых бактерий и грибов витесняет зооглейные скопления, что приводит к плохому оседанию активного ила и выносу его из вторичного отстойника. Очистка при этом ухудшается. Несмотря на то, что нитчатые бактерии и грибы являются хорошими минерализаторами, побочные явления, вызванные их массовым развитием, снижают эффект очистки.

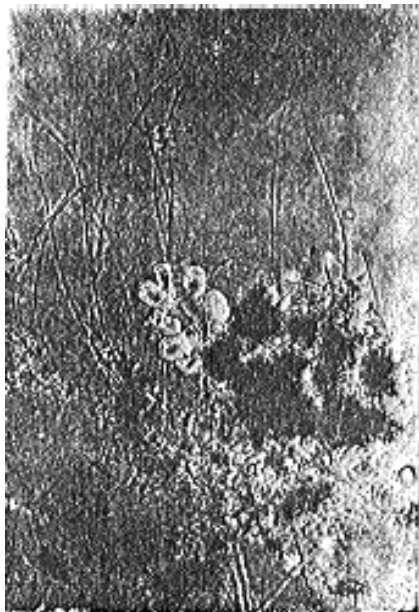


Рис. 6.3 – Вспухающий активный ил

Ил из регенератора

а) При удовлетворительной регенерации наблюдается количественный перевес *Peritricha* (*Carchesium*, *Vorticella convallaria*, *Opercularia*) перед свободноплавающими инфузориями. Увеличение количества организмов *Peritricha* и зооглей по сравнению с илом в аэротенке. Организмы подвижные. Хлопок ила большой, хорошо оседает. Вода над илом прозрачная.

б) При глубокой регенерации преобладают большие свободноплавающие инфузории. Увеличиваются размеры *Vorticella* и *Opercularia*. Хлопок ила распадается на более мелкие хлопочки. Вода над илом имеет мелкую мутность, которая не оседает.

Биопленка

В отличие от активного ила биоценоз биопленки имеет значительно большее разнообразие форм гидробионтов. При постоянной очистке воды в биофильтре меняется биоценоз биопленки и наблюдается изменение зон сапробности.

В верхнем горизонте биофильтра создаются условия для полисапробной или альфа-мезосапробной зон. В биопленке преобладают грибы, различные бактерии, особенно много нитчатых. Из простейших имеют преимущество бесцветные жгутиковые (роды *Oicomonas* и *Bodo*) и свободноплавающие инфузории отряда равноресничных, особенно *Paramecium*, из круглоресничных инфузорий только *Opercularia*. В биофильтре иногда наблюдаются представители зеленых водорослей и жгутиковых: *Selensastrum* и *Peranema*. Из червей в незначительном количестве встречаются коловратки и круглые черви.

При прохождении жидкости через биофильтр в биопленке уменьшается количество бактерий, грибов и бесцветных жгутиковых.

Увеличивается количество свободноплавающих крупных чреворесничных инфузорий, появляются разнообразные прикрепленные инфузории, увеличивается количество коловраток и круглых червей. В биопленке преобладают формы, присущие мезосапробной зоне.

6.2. Экспериментальная часть

Отбор проб для микроскопирования:

а) активный ил.

Из аэротенка отбирается иловая жидкость в пробирку в количестве 7-10 мл. Ил отстаиванием отделяется от жидкости (2-3 минуты) и затем пипеткой с широким отверстием отбирается для микроскопирования;

б) биопленка.

Из различных горизонтов биофильтра отбирается засыпной материал (шлак, щебень, керамзит и т.д.), помещается в фарфоровую чашку и заливается небольшим количеством дистиллированной воды. С засыпного материала пленку необходимо счищать препарированными иглами. Для микроскопирования биопленку отбирают пипеткой с широким отверстием.

Последовательность описания активного ила и биопленки:

1. Скорость оседания ила (быстро, медленно).
2. Цвет ила (бурый, черный, беловатый и т.д.).
3. Вода над илом (прозрачная, мутная, окрашенная).

Дальнейшее описание ведут при микроскопировании. Необходимо просмотреть не менее 10 полей зрения.

4. Плотность и размер хлопка (плотный, дробленый, крупный, мелкий).
5. Присутствие посторонних вкраплений.
6. Состав гидробионтов.
7. Количество гидробионтов по пятибалльной системе (см. ниже).
8. Наличие грибов и нитчатых бактерий.
9. Наличие свободноплавающих бактерий (много, мало).

Формы бактерий, которые преобладают (мелкие палочки, крупные палочки, спирали и т.д.).

Пункты 4-7 описываются при малом увеличении (объектив 8х10), а 8 и 9 - при большом увеличении (объектив х40).

Количество организмов оценивается по пятибалльной системе крестиками:

1 – единичное нахождение, 2 – мало, 3 – порядочно, 4 – много, 5 – массовое развитие. Отмечается также состояние организмов, их подвижность, работа реснитчатого аппарата.

Задание:

1. Промикроскопировать и дать описание образцов активного ила и биопленки (по схеме).
2. Назвать преобладающие формы гидробионтов. Дать количественную оценку развития гидробионтов по пятибалльной системе.
3. Сделать вывод о состоянии активного ила и биопленки.

Контрольные вопросы:

1. Назовите особенности экосистемы активного ила.
2. Каким образом осуществляется отбор проб активного ила и биопленки?
3. Какой объем воды отбирается для анализа состава активного ила?
4. В чем заключается общая характеристика активного ила?
5. Какие показатели оцениваются при анализе физиологического состояния организмов активного ила и биопленки?
6. Опишите виды количественного учета организмов активного ила и биопленки.
7. Как оценивается технологический процесс очистки воды по состоянию активного ила и биопленки?

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

ФОТОГРАФИИ ОСНОВНЫХ ВИДОВ ИНFUЗОРИЙ

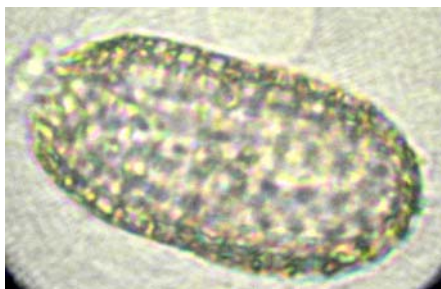


Фото 1. Колепс гиртус

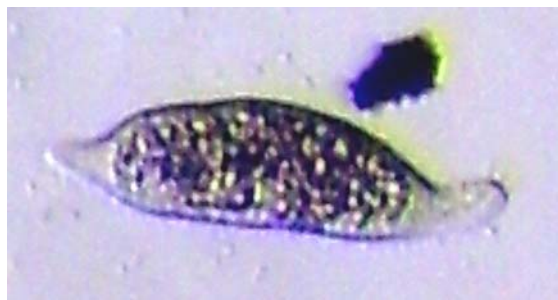


Фото 1. Дилептус ансер

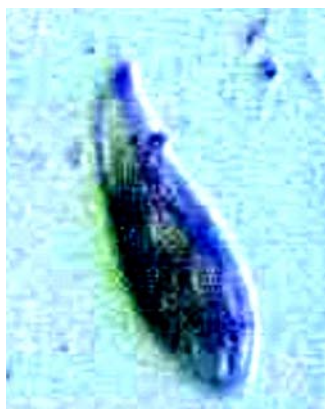


Фото 3. Спатидиум поркулюс

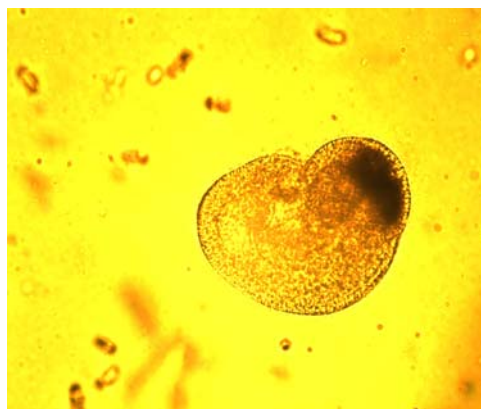


Фото 4. Кольпода кукулюс



Фото 5. Кольпода мапази

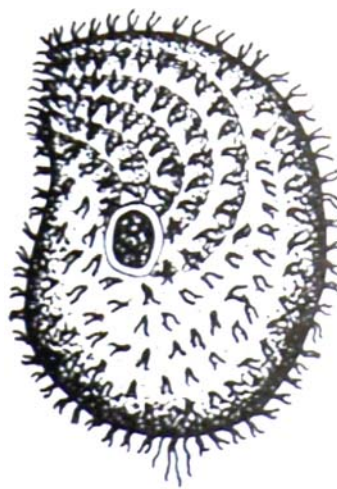


Фото 6. Кольпода штейни

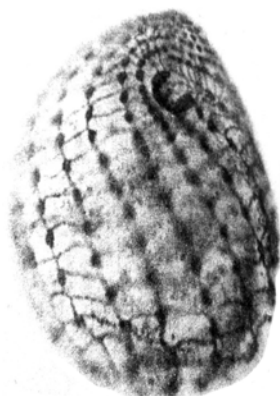


Фото 7. Кольпода аспера

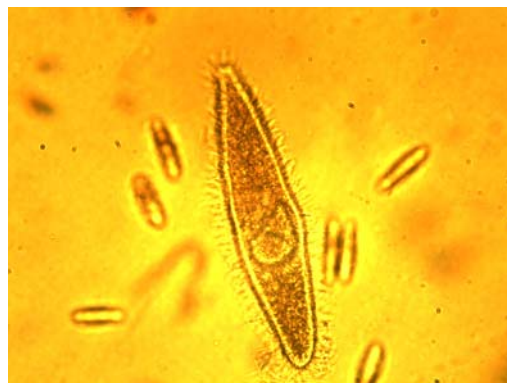


Фото 8. Инфузория-туфелька

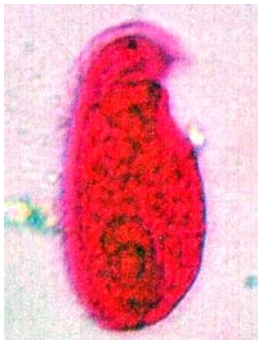


Фото 9. Кольпидиум кольпода



Фото 10. Уронема маринум

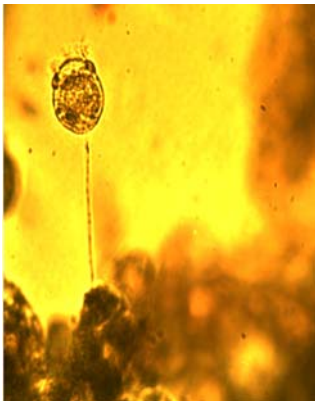


Фото 11. Вортицелла конваллярия
Сувойка



Фото 12. Стромбидиум



Фото 13. Уролептус писцис



Фото 14. Окситриха реллионелла



Фото 15. Стилоникия митилюс



Фото 16. Аспидиска костата

Тесты для идентификации патогенных и условно-патогенных микроорганизмов

Стафилококки. Морфологически *Staphylococcus* – грамположительные кокки, располагающиеся в виде характерных «виноградных гроздей». Патогенные стафилококки на кровяном агаре образуют колонии диаметром 2-3 мм, окруженные прозрачной зоной гемолиза; на молочно- или желточно-солевом агаре – колонии, окруженные зоной просветления (протеолитическая активность) и радужным венчиком (наличие фермента – лецитовителлазы).

Из подозрительных колоний делают высев на скошенный мясопептонный агар для выделения чистой культуры. После 24 ч инкубации при температуре 37°C проверяется *плазмокоагулирующая активность* культуры посевом в пробирки с 0,5 мл цитратной плазмы (человеческой или кроличьей) в разведении 1:4. Патогенные стафилококки коагулируют плазму в течение 2-24 ч в условиях термостата. Учет производят через 1, 2, 4 и затем 24 ч по образованию небольшого желеобразного сгустка на дне пробирки. Выделенные стафилококки подвергаются фаготипированию при необходимости установления источника возникновения стафилококковой инфекции и путей распространения.

Стрептококки. Один из представителей – *Str.viridans* (зеленящий стрептококк) – постоянный непатогенный обитатель зева. На кровяном агаре *Streptococcus* образуют мелкие (точечные) сероватые колонии с прозрачной зоной гемолиза (β -гемолитические) и колонии с зеленовато-бурым ореолом и повышенной прозрачностью среды (α -зеленящие). На кровяном агаре нередко рост стрептококков подавляется быстрорастущей другой микрофлорой воздуха. Поэтому учет лучше вести на чашках с элективными средами – Гарро и Туржецкого, в которые для подавления сопутствующей флоры добавляется генциан фиолетовый, обладающий бактериостатическими свойствами в отношении сапрофитов воздуха. Культивирование проводят при 37°C. После подсчета выросших колоний из подозрительных на стрептококки делают мазки (стрептококки располагаются короткими цепочками или скоплениями) и затем пересевают на кровяной агар или в сахарный бульон. В бульоне стрептококки образуют цепочки, в чем необходимо убедиться с помощью микроскопии мазков, приготовленных из характерного придонного осадка (в виде хлопьев или крошек на дне пробирки при прозрачном бульоне).

Опытным путем установлена следующая зависимость: если в 2-х чашках после экспозиции в 20 мин. развилось 2 колонии, то воздух считают чистым, если 3-4 – слабо загрязненным. В классах после занятий исследователями улавливалось до 50000 клеток зеленящего стрептококка в 1м³.

Таблица – Биохимические свойства грамотрицательных бактерий [4]

Род бактерий Наименование теста	БГКП				<i>Shigella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Salmonella</i>
	<i>Citrobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Escherichia</i>			
1. Окраска по Граму (24 ч)	-	-	-	-	-	-	-
2. Оксидаза (24 ч)	-	-	-	-	-	-	-
3. Образование индола	+	+	-	+	[-]	+ только <i>vulgaris</i> , остальн. –	-
4. Р.Фогеса - Проскауэра	-	+	+	-	-	-	-
5. Цитрат (среда Симмонса)	[+]	+	+	-	-	(+)	+
6. Образование сероводорода	-	-	-	-	-	+	+
7. Подвижность	+	-	+	+	-	+	+
8. Гидролиз желатины (22°C)	-	-	-	-	-	+	-
9. Образование кислоты из <i>D</i> -глюкозы	+	+	+	+	+	+	+
10. Образование газа из <i>D</i> -глюкозы	+	+	+	+	-	+	+
11. Образование кислоты из лактозы	(+)	+	+	+	-	-	+
12. Каталаза (24 ч)	+	+	+	+	+	+	+
13. Окисление-брожение	брожение	брожение	брожение	брожение	брожение	брожение	брожение

Условные обозначения:

+, - – положительный (отрицательный) тест наблюдается у 90-100% штаммов;

[+], [-] – 76-89% штаммов;

(+), (-) – 25-75% штаммов.

Escherichia coli. Колонии со среды Эндо пересевают в лактозный бульон с борной кислотой или в желчно-лактозную среду с бриллиантовым зеленым, предварительно нагретые до температуры 43-44°C (в водяной бане), и сразу после засева теплые пробирки помещают в термостат при температуре 43°C на 24 ч. Борная кислота и бриллиантовый зеленый, добавляемые в среды, являются ингибиторами сопутствующей флоры. Появление газообразования свидетельствует о присутствии *E. coli* в исследуемой воде. Если нет возможности сделать посев в лактозный бульон с борной кислотой, то идентификацию *E. coli* проводят по двум признакам: ферментация лактозы при температуре 44,5°C в течение 24 ч и способности образовывать индол. В этом случае подозрительные на *E. coli* колонии засевают параллельно в 2 пробирки: одну с полужидкой средой с лактозой, вторую – со средой для определения индола (бульон Хоттингера, пептонная вода или другая среда, содержащая триптофан), под пробку пробирки вставляют индикаторную бумажку на индол и инкубируют при температуре 44,5°C. Посевом в пробирки со средой ФКП-1 идентификация упрощается, так как в этой среде содержатся лактоза и триптофан. Положительный ответ дается при образовании газа (разложение лактозы) и индола (ферментация триптофана).

Тест Грегерсена. Этим тестом можно заменить окраску по Граму. В капле 3%-ного водного раствора КОН на предметном стекле эмульгируют бактериальную массу, взятую с плотной среды. Спустя несколько секунд после

перемешивания за петлей тянутся слизистые нити, что указывает на принадлежность исследуемой колонии к грамотрицательному виду. Грам(+) бактерии слизистые нити не образуют.

Каталазный тест. Наносят 1-2 капли 3% перекиси водорода непосредственно на исследуемую колонию. Появление пузырьков свидетельствует о выделении бактериями каталазы.

Оксидазный тест. Тест проводят с колониями микроорганизмов, выросшими на среде Эндо. Часть подозрительных колоний стерильной петлей переносят на фильтровальную бумагу, пропитанную реактивом: диметил-п-енилендиамином и α -нафтолом. Если микроорганизмы, выросшие на фильтре, выделяют оксидазу, цвет колонии через 2-5 мин. изменяется на сине-фиолетовый. Такие колонии не учитывают при анализе воды. Можно на фильтровальную бумагу с индикатором накладывать весь фильтр с выросшими на нем колониями. Колонии БГКП темно-красного цвета не изменяют своей окраски (так как кишечные палочки оксидазоотрицательны) и учитываются как представители фекального загрязнения воды.

В сомнительных случаях – при наличии колоний розовых или бесцветных (лактозоотрицательных), не обладающих оксидазной активностью, дополнительно определяют способность бактерий ферментировать глюкозу при температуре 37°C и проявлять протеолитическую активность на среде Эндо с молоком. Колонии учитывают как БГКП, если они образованы грамоотрицательными палочками, ферментирующими глюкозу до кислоты и газа и не обладающими протеолитической активностью.

Приложение В

Санитарно-микробиологические показатели для воды [5]

Категория воды	Показатели		
	микробное число	коли-титр	коли-индекс
Питьевая вода водопроводная	не более 100	не менее 300	не более 3
Вода фасованная	не более 20	не менее 300	не более 3
Вода питьевая из колодцев и каптажей родников	-	не менее 100	не более 10

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Мудрецова-Висс К. А. Микробиология, санитария и гигиена: учеб. для вузов. 7-е изд. / Мудрецова-Висс К. А., Кудряшова А. А., Дедюхина В. П. – М.: ИД «Деловая литература», 2001. – 388 с.
2. Санитарная микробиология / Н. В. Билетова, Р. П. Корнелаева, Л. Г. Кострикина и др. Под ред. С.Я. Любашенко. – М.: Пищ.пр-сть, 1980. – 352 с.
3. Фомин Г.С. Вода. Контроль химической, бактериальной и радиационной безопасности по международным стандартам: энциклопедический справочник. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во «Протектор», 2000. – 848 с.
4. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т.: Пер.с англ. / Под ред. Дж. Хоулта и др. - М.: Мир, 1997.
5. Государственные санитарные правила и нормы "Гигиенические требования к воде питьевой, предназначенной для потребления человеком" (ГСанПиН 2.2.4-171-10). – 2010.
6. Фауна азротенков (Атлас).- Л.: Наука, 1984. – 264 с.

Навчальне видання

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до лабораторних робіт

з дисципліни

«МІКРОБІОЛОГІЯ»

*(для студентів 4 курсу денної та заочної форм навчання
за напрямом підготовки 6.060103 «Гідротехніка (Водні ресурси)»
та слухачів другої вищої освіти
спеціальності 7.06010108 «Водопостачання та водовідведення»)*

(рос. мовою)

Укладач **КОВАЛЬОВА** Олена Олександрівна

Відповідальний за випуск *С. С. Душкін*

За авторською редакцією

Комп'ютерний набір *О. О. Ковальова*

Комп'ютерне верстання *К. А. Алексанян*

План 2012, поз. 115М

Підп. до друку 07.12.2012	Формат 60x84/16
Друк на різнографі.	Ум. друк. арк. 3,4
Тираж 50 пр.	Зам. №

Видавець і виготовлювач:

Харківський національний університет міського господарства імені О. М. Бекетова,
вул. Революції, 12, Харків, 61002

Електронна адреса: rectorat@kname.edu.ua

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи:

ДК № 4064 від 12.05.2011 р.